

Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum
Homburg/Saar

Direktor Prof. Dr. T. Pohlemann

ENTWICKLUNG EINES VERRIEGELTEN MARKNAGELS FÜR MÄUSEFEMORA

DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2010

vorgelegt von Simon Herwerth

geb. am 14.06.1982 in Tübingen

Gewidmet
meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	3
Abkürzungen	5
1 ZUSAMMENFASSUNG	8
1.1 Deutsche Zusammenfassung	8
1.2 Summary: development of a locked intramedullary nail for mice femora	11
2 EINLEITUNG.....	13
2.1 Hintergrund.....	13
2.2 Der Knochen.....	14
2.3 Frakturheilung	20
2.4 Frakturheilungsmodelle	25
2.5 Ziele der Arbeit.....	29
3 MATERIAL UND METHODIK.....	30
3.1 Entwicklung des LockingMouseNail	30
3.2 Ex vivo Analyse – Biomechanische Testung der Implantatsteifigkeit	30
3.3 In vivo Analyse.....	31
3.3.1 Tiere und Tierhaltung	31
3.3.2 Studiendesign.....	32
3.3.3 Operation und postoperativer Verlauf	33
3.3.4 Beurteilung der Frakturheilung.....	40
3.3.4.1 Radiologische Untersuchung	40
3.3.4.2 Biomechanische Untersuchung	41

3.3.4.3	Histologische Untersuchung.....	43
3.4	Statistik.....	46
4	ERGEBNISSE	47
4.1	Der LockingMouseNail	47
4.2	Ex vivo Analyse.....	50
4.3	In vivo Analyse.....	51
4.3.1	Postoperativer klinischer Verlauf	51
4.3.2	Ergebnisse der radiologischen Auswertung.....	52
4.3.3	Ergebnisse der biomechanischen Auswertung	54
4.3.4	Ergebnisse der histologischen Auswertung.....	55
5	DISKUSSION.....	60
5.1	Ex vivo Analyse der Implantatsteifigkeit	60
5.2	In vivo Analyse.....	61
5.3	Zukünftige Anwendungsmöglichkeiten.....	71
5.4	Fazit	72
6	LITERATURVERZEICHNIS	74
7	DANK.....	81
8	LEBENS LAUF	82

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
3D	dreidimensional
a	Jahr
Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
Ak	Antikörper
ANOVA	Analysis of Variance
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
ASBMR	American Society of Bone and Mineral Research
BMP	Bone morphogenetic protein
Ca	Calcium
CAD	Computer Aided Design
Cl	Chlor
cm	Zentimeter
CRP	C reaktives Protein
μ-CT	Mikro-Computertomographie
d	Tag
d.h.	das heißt
dest.	destilliert
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al	et alumnos
etc.	et cetera
G	Gauge
g	Gramm
ges.	gesamt
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Gr.	Größe
h	Stunde
H	Wasserstoff
IL	Interleukin
Inc.	Incorporation
KD	Knochendichte
Kg	Kilogramm

korr.	korrigiert
kV	Kilovolt
l	Liter
LMN	LockingMouseNail
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
Mg	Magnesium
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MW	Mittelwert
N	Newton
n. s.	nicht signifikant
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
O	Sauerstoff
OP	Operation
P	Phosphat
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor
pH	potentia Hydrogenii
PLM	Product Lifecylce Management
pos.	positiv
PTH	Parathormon
SD	standard deviation, Standardabweichung
SF	Standardfehler
sek.	Sekunden
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannte
µSi	Mikro-Sievert
Tab.	Tabelle
TGF-β	Tumor growth factor-Beta
TIFF	Tagged Image File Format

TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
U	Units
u.	und
USA	United States of America
UV	ultraviolett
v. a.	vor allem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vs.	Versus
w	weiblich
z.B.	zum Beispiel
zw.	zwischen

1 ZUSAMMENFASSUNG

1.1 Deutsche Zusammenfassung

In der Bundesrepublik Deutschland werden pro Jahr etwa 750000 Patienten aufgrund einer Fraktur stationär aufgenommen und behandelt [1]. Trotz einer Vielzahl an technischen Verbesserungen und Fortschritten bei der Behandlung von Frakturen kommt es nach wie vor bei ca. zehn Prozent der Knochenbrüche zu Fällen verzögerter oder ausbleibender Frakturheilung [2]. Die Gründe hierfür sind derzeit noch unzureichend bekannt. Die Frakturheilung stellt einen komplexen Prozess dar, in dessen Verlauf eine Vielzahl von Molekülen in einer zeitlich geregelten Abfolge miteinander interagiert. Zum besseren Verständnis dieser Prozesse sowie zur Erprobung neuer Therapieansätze stellt das Tiermodell eine unabdingbare Voraussetzung dar. Während tierexperimentelle Untersuchungen zur Frakturheilung in der Vergangenheit v. a. an Großtieren wie Schafen oder Schweinen durchgeführt wurden, ist die Maus nun zunehmend ins Zentrum traumatologischer Forschung gerückt. Aufgrund der großen Anzahl von Antikörpern und Primern sowie der Verfügbarkeit transgener Tiere und Knock-out-Stämmen ist die Maus insbesondere zur Analyse der molekularen Abläufe der Frakturheilung sehr gut geeignet.

Während bei der osteosynthetischen Versorgung menschlicher Frakturen und bei Großtiermodellen eine stabile Osteosynthese selbstverständlich ist, wurden Frakturen bei der Maus bis dato instabil versorgt oder überhaupt nicht stabilisiert. Da die mechanische Stabilität selbst einen großen Einfluss auf die Frakturheilung hat, ist jedoch auch bei der Maus eine stabile osteosynthetische Versorgung für standardisierte und reproduzierbare Frakturstudien von entscheidender Bedeutung. Aufgrund des Mangels an stabilen Osteosynthesetechniken für Mäuse soll in der hier vorliegenden Arbeit nun ein stabiles Osteosyntheseverfahren in Form eines neuen, verriegelten Marknagels für das Femur der Maus entwickelt werden.

Der LockingMouseNail (LMN) wurde basierend auf 3D-Rekonstruktionen von μ -CT-Aufnahmen eines Mäusefemur geplant und konstruiert. Er besteht aus einem Marknagel sowie zwei Verriegelungspins, die über einen ebenfalls zum System gehörenden Zielarm in das Femur eingebracht werden. An den Zielarm können des Weiteren verschiedene Sägelehren angebracht werden, mit deren Führung unter Verwendung einer Gigli-Drahtsäge definierte Segmentdefekte erzeugt werden können.

In einer zunächst durchgeführten biomechanischen ex vivo Analyse an Kadaverfemora zeigte der LMN eine signifikant höhere Steifigkeit als eine bisher zumeist verwendete intramedulläre Stabilisierung mittels eines Drahtpins.

In der im Anschluss durchgeführten in vivo Studie wurde die Frakturheilung bei insgesamt 42 CD-1 Mäusen mit Segmentdefekten von 0,00mm, 0,25mm und 2,00mm der rechten Femora untersucht. Die Analyse der Frakturheilung erfolgte bei Tieren mit 0,00mm und 0,25mm Osteotomiespalt nach zwei und fünf Wochen sowie bei Tieren mit 2,00mm Osteotomiespalt nach fünf und zehn Wochen mittels Biomechanik, Radiologie und Histologie (n=7 pro Gruppe und Zeitpunkt).

Bei der biomechanischen Testung mittels Dreipunktbiegung zeigte sich bei Tieren mit einem Frakturspalt von 0,00mm und 0,25mm nach fünf Wochen Analysezeitraum eine biomechanisch stabile Heilung mit signifikant höherer Biegesteifigkeit verglichen mit den übrigen untersuchten Gruppen. Weder nach fünf noch nach zehn Wochen kam es bei Tieren mit einem Frakturspalt von 2,00mm zu einer stabilen Frakturheilung mit einer Biegesteifigkeit von <1% im Vergleich zum gesunden kontralateralen Femur.

Histologisch und radiologisch zeigte sich ein zu den biomechanischen Ergebnissen korrespondierendes Bild. Tiere mit einem Frakturspalt von 0,00mm und 0,25mm wiesen nach zwei Wochen eine periostale Kallusbildung auf, jedoch noch keine knöcherne Überbrückung der Osteotomie. Tiere mit gleichem Frakturspalt zeigten nach fünf Wochen eine knöcherne Frakturheilung mit im Vergleich signifikant erhöhtem Knochenanteil am Kallusgewebe. Tiere mit einem großen Frakturspalt von 2,00mm zeigten weder nach fünf noch nach zehn Wochen eine knöcherne Heilung. Es kam hier nach fünf Wochen lediglich zu einer geringgradigen periostalen Kallusreaktion. Nach zehn Wochen präsentierten sich die Femora mit einer initialen Spaltbreite von 2,00mm als atrophe Pseudarthrosen mit

abgerundeten, sklerosierten Frakturenenden und fehlender knöcherner Überbauung des Osteotomiespalts sowie mit im Vergleich signifikant erhöhtem Bindegewebsanteil am Kallusgewebe.

Der hier vorgestellte LMN erlaubt eine standardisierte Osteosynthese für das Femur der Maus und bietet im Vergleich zu bisher verwendeten Osteosynthesetechniken eine signifikant erhöhte Stabilität. Durch die Möglichkeit, Segmentdefekte unterschiedlicher Größe zu stabilisieren, können sowohl die Abläufe bei der normalen Frakturheilung als auch die Vorgänge bei der Entstehung von atrophen Pseudarthrosen untersucht werden. Da die Therapie atropher Pseudarthrosen noch ein großes klinisches Problem darstellt, könnte der LockingMouseNail dazu beitragen, neue Therapieansätze im Tiermodell zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. Dies beinhaltet die Implantation neuer Knochenersatzstoffe in Femursegmentdefekte der Maus sowie die Untersuchung ihrer osteoinduktiven und –konduktiven Eigenschaften in vivo.

1.2 Summary: development of a locked intramedullary nail for mice femora

Every year about 750000 patients in Germany are admitted to a hospital because of bone fractures [1]. Although there is plenty of technical improvement and progress in the treatment of fractures, about ten percent of fractures still show impaired healing or even non-union formation [2]. The underlying reasons are not completely elucidated until now. Fracture healing describes a complex process where a plentitude of molecules interact in a chronologically regulated sequence. For a better understanding of these processes as well as for testing of new therapeutic approaches, the animal experiment forms an indispensable requirement. While previous animal fracture studies were conducted mainly in large animals like sheep or pigs, smaller animals and especially the mouse came increasingly into the focus of fracture research. The mouse especially allows the analysis of the molecular aspects of fracture healing due to a huge amount of available biomedical tools like antibodies, primers and the availability of transgenic mice and knockout strains.

Whereas a stable osteosynthesis is a matter of course in humans and large animal models, unstable fixation techniques have been used in the mouse or fractures were even left unstabilized. However, because fixation stability greatly influences fracture healing, stable osteosynthesis techniques are also of great interest in the mouse. The aim of this thesis is therefore the development of a stable osteosynthesis device for mice femora in form of a new locked intramedullary nail, a so-called LockingMouseNail.

The LockingMouseNail (LMN) was designed and constructed based on 3D reconstructions of μ -CT-scans of a mouse femur. It consists of an intramedullary nail and two locking pins which are implanted to the femur with the help of a special designed targeting arm building part of the system of the LockingMouseNail, too. Different templates for guidance of a Gigli-wire-saw have been developed for the creation of standardized osteotomies.

In a biomechanical ex vivo analysis in cadaveric femora the LockingMouseNail achieved a significant higher stability compared to a simple intramedullar nail, a technique which is used most frequently in the mouse at the moment.

Subsequently, fracture healing was analyzed in vivo in a total of 42 CD-1 mice with segmental defects of 0.00mm, 0.25mm and 2.00mm of the right femora by biomechanical, radiological and histological testing (n=7 for each group and time point). Animals with an osteotomy gap of 0.00mm and 0.25mm were killed after two and five weeks, whereas animals with a gap size of 2.00mm were killed after five and ten weeks.

Biomechanical three-point-bending tests showed significant higher bending stiffness for animals with a fracture gap of 0.00mm and 0.25mm after five weeks of healing compared to all other groups. Neither after five weeks nor after ten weeks animals with a gap size of 2.00mm showed stable fracture healing with a bending stiffness of <1% compared to the contralateral healthy femur.

Histological and radiological findings were in accordance with the biomechanical results. Animals with a gap size of 0.00mm and 0.25mm showed periosteal callus formation after two weeks of healing but no bony bridging of the osteotomy. After five weeks all mice with a gap size of 0.00mm and 0.25mm showed complete bony bridging of the osteotomy gap and remodelling has begun, as indicated by a reduction of periosteal callus size. In contrast, animals with the big gap size of 2.00mm did not show bony bridging of the osteotomy, neither after five weeks nor after ten weeks. After ten weeks, femora with a gap size of 2.00mm presented as atrophic non-unions with abundant connective tissue within the segmental defect.

The herein introduced LockingMouseNail allows standardized osteosynthesis of the mouse femur with a significantly increased stability compared to previously described osteosynthesis techniques. The possibility to stabilize also segmental defects allows analysis of the course of normal fracture healing as well as an impaired healing response with non-union formation. Because atrophic non-union still is a major clinical problem, the LockingMouseNail could be used in further studies to evaluate and compare new treatment strategies. This includes analysis of osteoinductive and osteoconductive properties of new bone substitutes and tissue engineered constructs.

2 EINLEITUNG

2.1 Hintergrund

Verletzungen und Erkrankungen der Haltungs- und Bewegungsorgane stellen neben Tumorerkrankungen und kardiovaskulären Erkrankungen eine wichtige Ursache für Morbidität dar. Die weltweite Bedeutung der muskuloskeletalen Erkrankungen zeigt sich auch in der Ausrufung der sogenannten Bone and Joint Decade 2000-2010, einer weltweiten Initiative, die u. a. in Kooperation mit der WHO die Prävention, Therapie und Rehabilitation muskuloskeletaler Erkrankungen optimieren soll. V. a. Verletzungen von Knochen gehen mit einem langem Behandlungsverlauf, Immobilität, Arbeitsunfähigkeit und damit verbundenen hohen sozioökonomischen Kosten einher. In der Bundesrepublik Deutschland werden jährlich mehr als 750.000 Menschen als Folge eines Knochenbruches stationär aufgenommen und behandelt [1]. Trotz sich stetig verbessernder Therapiemöglichkeiten kommt es noch immer in 5-10% der Fälle zu Verläufen mit verzögerter oder ausbleibender Frakturheilung [3]. Dies liegt nicht zuletzt daran, dass die Mechanismen der Frakturheilung noch nicht vollständig verstanden sind. Das bedeutet, dass die Behandlung von Knochenbrüchen noch weiter verbessert werden kann, wenn das Wissen über die Mechanismen der Frakturheilung erweitert wird.

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es viele neue Therapiestrategien zur Behandlung von Knochenbrüchen [4]. Dennoch besteht insbesondere bei gestörtem Heilungsverlauf kein Konsens über die optimale Therapie. Hier ist es nun an der Wissenschaft, neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln und zu vergleichen, um so insbesondere die Behandlung einer gestörten Frakturheilung zu verbessern und eine Pseudarthrosenbildung zu verhindern. Erkenntnisse über die molekularen Abläufe, welche die Heilung positiv oder negativ beeinflussen, sind die Basis zum Verständnis der Frakturheilung und zur Entwicklung neuer Therapieansätze. Eine durch diese Erkenntnisse verbesserte

Behandlung von Patienten mit gestörter Frakturheilung ist sowohl hinsichtlich des Patientenwohls als auch aus gesundheitsökonomischen Aspekten wünschenswert.

2.2 Der Knochen

2.2.1 Aufbau des Knochens

Das Knochengewebe ist ein auf Stütz- und Haltefunktion spezialisiertes Bindegewebe. Es hat besondere Eigenschaften, nämlich eine hohe Zug- und Druckfestigkeit und eine gewisse Elastizität bei effektiver Leichtbauweise. Diese Eigenschaften basieren auf der Zusammensetzung des Knochengewebes aus organischem Material und eingelagerten Kalziumsalzen. Der organische Anteil der Knochenmasse macht ca. 35% seiner Gesamtmasse aus, der mineralische Anteil beträgt ca. 65% der Gesamtknochenmasse [5].

Neben der Funktion als Halte- und Stützapparat des Körpers erfüllt der Knochen auch eine metabolische Funktion. Er dient als Speicherorgan für verschiedene Ionen, vor allem für Kalziumionen. Kalzium ist ein wesentliches Ion bei zahlreichen Körperfunktionen, wie zum Beispiel der Muskelkontraktion, der Erregungsweiterleitung oder der Gerinnungskaskade des Blutes. Neben Kalzium werden u. a. auch Phosphorionen und Magnesiumionen im Knochengewebe gespeichert und bei Bedarf freigesetzt.

Knochengewebe ist ein sehr dynamisches Gewebe. Es befindet sich in ständigem Umbau, hat einen hohen Stoffumsatz und ist reich durchblutet. Bereits 1892 erkannte Julius Wolff, dass sich der Knochen entsprechend seiner mechanischen Anforderung ständig umbaut mit Knochenaufbau an Orten hoher Belastung und Knochenabbau an Orten geringer Belastung [6].

Makroskopisch lassen sich zwei Typen von Knochengewebe unterscheiden:

1. kompaktes Knochengewebe (auch Kortikalis oder Substantia compacta genannt)
2. spongiöses Knochengewebe (auch Spongiosa oder Substantia spongiosa genannt)

Die Substantia compacta erscheint als eine solide, feste Knochenmasse. V. a. die Diaphysen der Röhrenknochen bestehen aus diesem kompakten, lamellären Knochengewebe. Zur Metaphyse hin wird die Substantia compacta dünner, und es überwiegt die Substantia spongiosa.

Die Substantia spongiosa ist aus einem feinen System sich verzweigender Knochenbälkchen (Trabekel) aufgebaut. Die Trabekel sind parallel zur größten Druck-/Zugbelastung der Knochen ausgerichtet. Die Trabekelbauweise führt zu einer hohen mechanischen Stabilität des Knochens bei geringem Gewicht. An der Metaphyse und Epiphyse benötigt der Körper eine flächige Kraftaufnahme am „breiten“ Gelenk. In Richtung Diaphyse wird die Kraft auf einen geringeren Querschnitt übergeleitet, weshalb an dieser Stelle eine dickere Substantia compacta erforderlich ist. Zwischen den Trabekeln befinden sich weite Räume für blutbildendes Gewebe und Fettgewebe (Knochenmark).

Mikroskopisch ist der Aufbau von Substantia compacta und Substantia spongiosa ähnlich. Er ist durch einen lamellären Aufbau beschrieben. Die „Baueinheiten“ des Knochens werden aus Knochenlamellen gebildet. Diese sogenannten Speziallamellen sind 3 – 7 µm dick und lagern sich konzentrisch um längs verlaufende Gefäße, wobei sich bis zu zwanzig Lamellen übereinander lagern können. Die so gebildeten Einheiten heißen Osteone oder Havers-Systeme. Sie kommen vor allem in der Substantia compacta vor und werden einige Zentimeter lang. Den freien Raum zwischen den runden Osteonen füllen sogenannte Schaltlamellen aus. An der äußeren und inneren Oberfläche wird die Substantia compacta von Generallamellen umgeben. Die äußere Generallamelle grenzt den Knochen nach außen ab, die innere kleidet die Markhöhle des Knochens aus [5].

Im Inneren eines Osteons befinden sich als Hohlräume sogenannte Havers-Kanäle. In ihnen verlaufen ein bis zwei kleine Blutgefäße. Sie sind durch querverlaufende Volkmann-Kanäle miteinander verbunden. Diese spielen eine Rolle bei der Verbindung von Gefäßen der Markhöhle und Gefäßen der äußeren Knochenoberfläche.

Die organischen Bestandteile des Knochengewebes bestehen zu 90% aus Kollagen vom Typ I. Die Kollagenfasern sind parallel zueinander angeordnet. Sie verlaufen helikal in Lamellen der Osteone um die Gefäßachse des Osteons. Zusätzliche organische Bestandteile des Knochengewebes sind weitere Kollagentypen (u. a. Typ II, IV, XI) und extrazelluläre

Matrixproteine wie z. B. Osteonectin, Osteocalcin, Osteopontin und Subtypen der BMPs (bone morphogenetic proteins) [7].

Der anorganische Teil des Knochengewebes wird vor allem von kristallinem Kalziumphosphates gebildet. Im Körper wird v. a. Hydroxylapatit gebildet ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$). Apatitkristalle sind nadelförmig und ca. 40nm lang bei einer Dicke von 1,5 – 3nm. Die Mineralisierung des Knochengewebes startet an den Kollagenfasern. Hier lagern sich in regelmäßigen Abständen Apatitkristalle an den Fasern an.

Im Knochen der Maus kommen die oben beschriebenen Havers-Systeme nicht vor [8]. Die Ursachen und Auswirkungen dieses Fehlens von Havers-Systemen sind noch nicht geklärt. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen von Havers-Systemen bei Mäusen ist die kurze Lebensdauer dieser Tiere. Bei länger lebenden Tieren (Hunde, Katzen) wurden Havers-Systeme beschrieben. Ein wichtiger Grund könnte jedoch sein, dass aufgrund der kleinen Größe der Knochen der Maus die Blutversorgung des Knochengewebes von periostal und endostal ausreichend ist und somit eine Ausbildung eines Havers-Systems innerhalb des Knochens überflüssig macht [9].

Die Substantia spongiosa ist ebenfalls lamellenartig aufgebaut. Sie bildet aber in der Regel im Gegensatz zur Substantia compacta keine Osteone, sondern Lamellen, die sich entsprechend der auf sie wirkenden Kräfte ordnen bzw. ausrichten.

Im Knochengewebe kommen unter anderen folgende für den Knochenumbau verantwortliche Zellen vor:

1. Osteoprogenitorzellen (Knochenaufbau)
2. Osteoblasten (Knochenaufbau)
3. Osteozyten (Knochenaufbau)
4. Osteoklasten (Knochenabbau)

Die drei erstgenannten Zellen sind Formen des gleichen Zelltyps in unterschiedlichen Differenzierungsphasen.

Osteoprogenitorzellen sind Vorläuferzellen der Osteoblasten und differenzieren sich aus mesenchymalen Stammzellen. Sie befinden sich v. a. in Endost und Periost, welche den Knochen innen bzw. außen überziehen, aber auch im Knochenmark und im zirkulierenden Blut. Die Osteoprogenitorzellen und mesenchymalen Stammzellen werden bei Frakturen und Umbauvorgängen des Knochens aktiviert, zur Teilung und Differenzierung angeregt und durch chemotaktisch wirkende Signalmoleküle, wie z. B. IGF-I und II, an den Ort der Fraktur geleitet [10].

Osteoblasten sind jene Zellen, die Knochenmatrix produzieren. Zu den wichtigsten Molekülen der Knochenmatrix gehören unter anderem Kollagene, Proteoglykane und Osteopontin. Osteoblasten sind an der Knochenoberfläche lokalisiert. Die primär von Osteoblasten produzierte Knochenmatrix heißt Osteoid und ist noch nicht mineralisiert. Bei Heilungs- oder Umbauvorgängen im Knochen wirken Signalmoleküle wie VEGF und BMP-2 chemotaktisch auf Osteoblasten [11, 12]. An der Knochenoberfläche befindet sich immer ein schmaler, nicht-mineralisierter Osteoidsaum.

Damit bei Umbauvorgängen oder vermehrtem Kalziumbedarf Knochensubstanz abgebaut werden kann, muss zunächst dieser Osteoidsaum abgebaut werden. Der Abbau des Osteoidsaums wird zunächst von Osteoblasten durchgeführt [5]. Sie haben Rezeptoren für Parathormon, ein Hormon, das von den Epithelkörperchen der Schilddrüse produziert und bei Kalziumbedarf sezerniert wird. Nach Parathormonbindung bauen die Osteoblasten den Osteoidsaum ab und aktivieren Osteoklasten, die dann die mineralisierte Knochensubstanz abbauen und so den Kalziumspiegel im Blut erhöhen.

Osteozyten sind differenzierte Osteoblasten, die in die Lamellen des Knochengewebes eingelagert sind. Sie befinden sich in Lakunen innerhalb der mineralisierten Knochenmatrix. Für den Austausch von Nährstoffen (z. B. Elektrolyte) sind sie über Nexus miteinander verbunden [13]. Auf diese Weise ist auch ein Nährstofffluss von den an der Oberfläche liegenden Osteoblasten zu den Osteozyten möglich.

Osteoklasten sind die Zellen, die für die Resorption der mineralisierten Knochenmatrix verantwortlich sind. Osteoklasten liegen an der Knochenoberfläche in flachen Aushöhlungen, sogenannten Howship-Lakunen. Die Zelloberfläche der Osteoklasten bildet an der Kontaktfläche zum Knochen viele kleine Falten aus, die sogenannte „ruffled border“

[14]. An diesem Faltensaum befinden sich viele Lysosomen und Mitochondrien, die für den Abbau des Knochens benötigt werden. Über Integrine an der Zelloberfläche binden Osteoklasten an Knochenmatrixproteine wie Osteopontin [15]. So bildet sich eine funktionell abgegrenzte Zone zwischen Osteoklast und Knochen, in der die Knochenmatrix resorbiert wird [5].

Skelettknochen sind an ihrer äußeren Oberfläche von Periost überzogen. Es ist ein gut vaskularisiertes Bindegewebe, das die Fähigkeit zur Bildung von Knochengewebe besitzt [7].

Beim wachsenden Knochen werden beim Periost drei Schichten unterschieden:

1. Adventitia
2. Fibroelastika (Stratum fibrosum)
3. Kambiumschicht (Stratum osteogenicum)

Die äußerste Schicht ist die Adventitia, die reich an Blutgefäßen ist. Aus ihr gelangen Gefäße in die bereits beschriebenen Volkmann- und Haverskanäle und in das Knochenmark [5].

Die in der Mitte gelegene Fibroelastika besteht aus straffen, längs der Knochenachse ausgerichteten Kollagenfasern und elastischen Fasern, die teilweise in die Substantia compacta des Knochens einstrahlen. Diese einstrahlenden Fasern werden Sharpey-Fasern genannt, sie verbinden das Periost mit dem Knochen. Häufig kommt es zur Verkalkungen der Sharpey-Fasern [5].

Die innerste Schicht ist die Kambiumschicht. In ihr befinden sich viele mesenchymale Knochenstammzellen, Osteoprogenitorzellen und weitere Vorstufen von Osteoblasten. Bei Bedarf wandeln sich diese in aktive Osteoblasten um und bewirken einen Anbau von Knochengewebe an bereits bestehendes Knochengewebe. Dieser Vorgang wird als appositionelles Dickenwachstum bezeichnet.

Das Endost kleidet die inneren Oberflächen in Knochen aus. Es besteht aus Osteoprogenitorzellen und inaktiven Osteoblasten (bone lining cells). Es hat eine viel geringere Aktivität als das Periost in Bezug auf Wachstum und Umbauvorgänge [5].

2.2.2 Knochenbildung

Man unterscheidet zwei verschiedene Arten der Knochenbildung:

1. intramembranöse Ossifikation (direkte Knochenbildung)
2. chondrale Ossifikation (indirekte Knochenbildung)

Bei der intramembranösen (desmalen) Ossifikation wird Knochengewebe direkt ohne vorherige Zwischenstufe gebildet. Das Schlüsselbein (Clavicula) und einige flache Schädelknochen werden auf diese Weise gebildet. Die mesenchymalen Stammzellen differenzieren sich an sogenannten Ossifikationspunkten zu Osteoblasten. Diese produzieren dann neues Knochengewebe, das zunächst ein Netzwerk von feinen Trabekeln bildet. Die Trabekel sind zu diesem Zeitpunkt parallel zum Gefäßnetz angeordnet. Man nennt dieses Knochengewebe Geflechtknochen oder „woven bone“. Im Gegensatz zum Lamellenknochen sind die Kollagenfasern und Knochenbälkchen hier noch ungeordnet ausgerichtet.

Durch die Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten wird der Geflechtknochen nach und nach zu Lamellenknochen umgebaut im Sinne einer Anpassung an die mechanische Beanspruchung [6].

Bei der chondralen Ossifikation hingegen wird erst eine Knorpelmatrix gebildet, die dann in einem zweiten Schritt durch Knochen ersetzt wird. Die meisten Knochen des menschlichen Körpers entstehen auf diese Weise, wie z. B. die langen Röhrenknochen der Extremitäten. Diese Art der Knochenbildung findet auch im Rahmen des Längenwachstums in den Wachstumsfugen (Epiphysenfugen) der Röhrenknochen statt. Das Längenwachstum der Knochen ist abgeschlossen, wenn die knorpelige Wachstumsfuge verknöchert.

Unterschieden werden zwei Schritte der chondralen Ossifikation:

1. perichondrale Ossifikation
2. enchondrale Ossifikation

Bei der perichondralen Knochenbildung bildet sich eine Knochenmanschette um den knorpelig angelegten Schaft (Diaphyse) des zu bildenden Knochens. So wird dem knorpelig angelegten Schaft Stabilität verliehen. Das umgebene Knorpelgewebe entwickelt sich zu sogenanntem Blasenknorpel und verkalkt zunehmend. Die Kalzifizierung basiert auf der Absonderung von kleinen Vesikeln mit Kalzium (Matrixvesikel) aus der Membran der Knorpelzellen (Chondrozyten) in die extrazelluläre Matrix [16]. Der Knorpel stirbt dabei langsam durch Apoptose (programmierter Zelltod) ab [7]. In den verkalkten Knorpel dringen Blutgefäße ein, was zum Beginn der enchondralen Ossifikation führt [17].

Mit den Blutgefäßen gelangen auch knorpelabbauende Zellen in den verkalkten Blasenknorpel. Diese Chondroklasten schaffen neue Hohlräume, in denen sich Osteoprogenitorzellen anlagern, um sich zu Osteoblasten zu differenzieren. Von den Osteoblasten wird neue Knochensubstanz produziert und es entsteht neuer Geflechtknochen. Die Trabekel des Geflechtknochens verwachsen mit der perichondralen Knochenmanschette.

2.3 Frakturheilung

Die Frakturheilung ist ein komplexer Vorgang, bei dem verschiedene aufeinander abgestimmte molekulare Prozesse in einer zeitlich definierten Reihenfolge interagieren um die Integrität des Knochens wieder herzustellen.

Der Heilungsverlauf kann hier in fünf Abschnitte eingeteilt werden [18].

1. Zunächst füllt ein Frakturhämatom den Frakturspalt, worauf es nachfolgend zu einer Entzündungsreaktion kommt [19]. Von inflammatorischen Zellen, die sich im Frakturhämatom befinden, werden Zytokine (Entzündungsmediatoren) wie Interleukin 1 und Interleukin 6 sezerniert. Diese Mediatoren sind wichtig für die frühen Abläufe der Frakturheilung. Außerdem werden Proteine der TGF- β -Superfamilie und andere Wachstumsfaktoren wie PDGF sezerniert, welche die Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu osteogenen Zellen regulieren [7, 20].
2. Anschließend kommt es zur Einsprossung von neuen Blutgefäßen (Angiogenese), und unter der Einwanderung von Fibroblasten, Chondroblasten und Makrophagen entwickelt sich im Rahmen einer enchondralen Frakturheilung ein knorpeliger Kallus.
3. Die Matrix dieses sogenannten „soft callus“ verkalkt in einem nächsten Schritt durch Einlagerung von Mineralkristallen.
4. Danach wird der knorpelige Kallus durch einsprossende Gefäße vaskularisiert. Begeleitet werden diese Gefäße von Osteoblasten, welche den knorpeligen Kallus knöchern umbauen.
5. Abschließend kommt es nach knöcherner Überbauung der Fraktur im letzten, länger andauernden Schritt durch Osteoklasten zum Remodeling, dem Umbau des Geflechtknochens in lamellären, stabileren Knochen [7].

Man unterscheidet histologisch zwei Formen der Frakturheilung, die sekundäre Frakturheilung und die primäre Frakturheilung mit Kallusbildung.

Handelt es sich um einen Frakturspalt mit möglichen Mikrobewegungen zwischen den Frakturrenden, kommt es zur sekundären Frakturheilung mit Kallusbildung [18, 21]. Als Kallus wird neu gebildetes Gewebe bezeichnet, das als Reaktion auf eine Fraktur oder Verletzung des Knochens entsteht, um die Kontinuität zwischen Knochenfragmenten wiederherzustellen. Im weiteren Verlauf der Heilung wird dieser weiche Kallus durch Einlagerung von Mineralien und Knochenzellen zu einem stabilen Knochenkallus

umgebaut. In der Praxis tritt diese Form der Frakturheilung in der Großzahl der Fälle auf. Hierbei kann Knochen ähnlich den embryonalen Prozessen der Osteogenese auf zwei Arten gebildet werden:

1. enchondrale (indirekte) Knochenbildung
2. intramembranöse (direkte) Knochenbildung

Die chondrale Knochenbildung bildet über Knorpelzwischenstufen neues Knochengewebe, vergleichbar mit dem Knochenwachstum im Bereich der Wachstumsfuge. Der zuerst gebildete Knorpel wird im Heilungsverlauf kalzifiziert und durch das Wirken von Osteoklasten und Osteoblasten zu Knochengewebe umgewandelt. Die Kalzifizierung des knorpeligen Kallus kann erst beginnen, wenn dieser eine bestimmte Größe und Stabilität erreicht hat (critical mass). Erst dann werden von den hypertrophen Chondrozyten im Kallus ausreichend Matrixvesikel mit Kalzium abgesondert [16].

Die chondrale Knochenbildung entwickelt sich in der Regel in unmittelbarer Nähe des Frakturspaltes.

Die intramembranöse Knochenbildung hingegen vollzieht sich während der Frakturheilung vom Periost oder Endost ausgehend. Sie ist mit der desmalen Knochenbildung vergleichbar, die bei der Entstehung von Knochen wie Schlüsselbein und Schädelkalotte auftritt. Diese Form der Knochenbildung tritt im Vergleich zur oben genannten chondralen Knochenbildung typischerweise etwas weiter entfernt vom Frakturspalt auf. Dieser Teil des Kallus bildet sich nicht über weiche Knorpelvorstufen, sondern direkt durch mesenchymale Stammzellen, die sich zu knochenbildenden Zellen differenzieren. Sie bilden einen von Beginn an harten Kallus aus Geflechtknochen [7].

Durch anatomische Reposition der Frakturrenden und absolut stabile Fixation (durch Osteosynthese) kommt es dagegen zur primären Frakturheilung. Als Osteosynthesematerialien werden hierbei im klinischen Alltag Zugschrauben oder Kompressionsplatten verwendet. Durch den engen Kontakt der Frakturrenden überbrücken Osteoklasten und Kapillaren den Frakturspalt direkt und bilden Resorptionskanäle, welche

neu gebildeten Havers-Kanälen entsprechen. Osteoblasten füllen anschließend diese Hohlräume mit Knochengewebe, was zur Stabilisierung der Fraktur führt. Diese Vorgänge finden in kleinen Einheiten statt, sogenannten „cutting cones“ [7]. Diese Form der Frakturheilung ist im Vergleich zur sekundären Frakturheilung eher selten im klinischen Alltag [22].

Verschiedene Gewebe und Teile des Knochens tragen in unterschiedlichem Maße zur Knochenregeneration und somit zur Frakturheilung bei [7]:

1. Kortikalis
2. Periost/Endost
3. umgebende Weichteile (z. B. Muskelgewebe)
4. Knochenmark im Bereich der Fraktur

Von der Kortikalis oder Substantia compacta geht bei der primären Frakturheilung die Knochenneubildung aus, wobei sich sogenannte cutting cones bilden, welche auch im Rahmen normaler Umbauprozesse für das Remodeling des Knochens verantwortlich sind. Periost, umgebendes Weichteilgewebe und Knochenmark spielen hierbei eine sehr geringe Rolle [16].

Zellen und Signale, die für die sekundäre Frakturheilung verantwortlich sind, stammen nach heutigem Kenntnisstand vermutlich vor allem aus dem Periost (Knochenhaut) und den umliegenden Weichteilen [7]. Dies zeigt sich an einer verminderten Kallusbildung und schlechteren Heilung nach Entfernung des Periosts [23, 24].

Die Wichtigkeit der Rolle des Knochenmarks im Frakturbereich für die Frakturheilung ist laut aktueller Datenlage umstritten [7, 18]. Innerhalb von vierundzwanzig Stunden nach Fraktur des Knochens beginnen osteoblastische Zellen aus dem Knochenmark damit, neues Knochengewebe zu produzieren [25]. Dies findet in der frühen Phase (nach wenigen Tagen) der Knochenheilung statt und ist dabei unabhängig von der mechanischen Stabilität der Fraktur [7].

Entscheidenden Einfluss auf die Frakturheilung haben die biomechanischen Verhältnisse, die im Bereich der Fraktur herrschen. Diese beeinflussen die Frakturheilung, das Ausmaß der Kallusbildung und die Vaskularisierung im Bereich der Fraktur [21, 26, 27]. Neben einer Reposition der Frakturenden ist eine Retention wesentliche Voraussetzung zur adäquaten Knochenheilung. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Instabilität zu einer verzögerten oder gar ausbleibenden Frakturheilung führt. Das gebildete Kallusgewebe ist hier aufgrund der Instabilität zwischen den beiden Frakturenden nicht in der Lage, den Frakturspalt knöchern zu überbrücken [28]. Allerdings haben weitere Untersuchungen gezeigt, dass sich ein gewisser Grad an interfragmentärer Bewegung positiv auf die Frakturheilung auswirken kann [21]. Dies ist darin begründet, dass ein gewisses Maß an interfragmentärer Bewegung die Kallusbildung stimulieren kann [18, 29]. Der positive Effekt auf die Frakturheilung besteht aber nur bis zu einer bestimmten Grenze. Wird diese überschritten, ist die Frakturheilung gestört und es kann u. a. zur Entstehung von hypertrophen Pseudarthrosen kommen. Auch der Zeitpunkt, an dem interfragmentäre Bewegungen auf die heilende Fraktur wirken, hat Einfluss auf den Heilungsverlauf. Ein hohes Maß an Bewegungen zu einem sehr frühen Zeitpunkt des Heilungsprozesses, z. B. in den ersten Tagen nach Fraktur, führt zwar zu einer vermehrten Kallusbildung, welcher aber wenig Stabilität aufweist. In diesen Fällen ist die Heilung gestört und der Kallus von geringerer Qualität [28]. Zusammenfassend und in Übereinstimmung mit der klinischen Erfahrung lässt sich sagen, dass stabile Verhältnisse im Frakturbereich Grundvoraussetzung für eine Heilung des Knochens sind.

Neben einer Instabilität der Frakturenden können verschiedene andere Faktoren die Frakturheilung negativ beeinflussen. Den Extremfall einer gestörten Frakturheilung stellt die ausbleibende Frakturheilung mit Pseudarthrosenbildung dar. Bei etwa sechs bis zehn Prozent aller Frakturen ist die Frakturheilung gestört und es kommt zur Bildung von Pseudarthrosen, wobei die Ursachen multifaktoriell sind [3]. Neben einer mangelnden vaskulären Versorgung, ausgeprägten Weichteilschäden und Infektion gilt v. a. ein hohes Maß an Instabilität zwischen den Frakturenden als Grund für deren Entstehung. Zum einen kann es zur Bildung einer hypertrophen Pseudarthrose kommen, bei der durch mangelnde Stabilität der Osteosynthese eine überschießende Gewebsvermehrung im Frakturspalt ohne Überbauung der Fraktur stattfindet. Zum anderen kann eine atrophe Pseudarthrose

entstehen. Hier kommt es zu einem Ausbleiben der Kallusbildung mit Abrundung der Frakturenden. Insbesondere die atrophe Pseudarthrose stellt ein klinisches Problem dar und erfordert oft multiple operative Interventionen [30].

2.4 Frakturheilungsmodelle

Zur Untersuchung der Frakturheilung ist es notwendig, geeignete wissenschaftliche Modelle zu entwickeln. Ex vivo Studien stellen eine Option dar, einzelne zelluläre Abläufe zu untersuchen, sind jedoch zur Untersuchung der Frakturheilung aufgrund der Komplexität der Abläufe nur begrenzt einsetzbar. Hier sind tierexperimentelle Modelle von entscheidender Bedeutung, um die Mechanismen der normalen und gestörten Frakturheilung zu untersuchen [31-33]. Während frühere Frakturheilungsmodelle v. a. bei Großtieren wie Schafen durchgeführt wurden, ist in jüngerer Zeit die Maus zunehmend ins Interesse der Forschung gerückt, v. a. um die molekularen Mechanismen der Frakturheilung zu analysieren [7, 34, 35]. Dies ist speziell bei der Maus, im Vergleich zu anderen Spezies, durch eine große Verfügbarkeit von Antikörpern, Knockout-Mäusen, transgener Tiere etc. sehr gut möglich. Ein weiterer Vorteil der Maus als Versuchstier ist die kleine Größe der Tiere im Vergleich zu Schweinen oder Schafen. Hierdurch ist sie als Versuchstier einfacher und billiger zu halten und in Bezug auf Narkose und postoperatives Management unkomplizierter zu versorgen. In der Vergangenheit wurden tierexperimentelle Versuche auf dem Gebiet der Frakturheilung vorwiegend an größeren Tieren wie Schafen und Hunden durchgeführt. Man ging davon aus, dass die biomechanischen Verhältnisse und die Knochenstruktur den Verhältnissen beim Menschen ähnlicher sind und die Erkenntnisse aus dem Tiermodell eher in die klinische Praxis übertragbar seien. Während viele Fragestellungen immer noch nur im Großtiermodell beantwortet werden können, sind Kleintiermodelle insbesondere zur Untersuchung molekularer Mechanismen Großtiermodellen deutlich überlegen. Jedoch herrscht im Vergleich zum Mensch und Großtier, bei denen eine stabile Osteosynthese selbstverständlich ist, bei der Maus derzeit ein Mangel an stabilen Osteosynsetechniken.

Dies liegt v. a. an der geringen Größe des Tieres, die eine stabile Osteosynthese mit herkömmlichen Implantaten verhindert.

Ziel eines Frakturmodells ist es, den Heilungsprozess bei der Frakturheilung des Menschen möglichst nahe widerzuspiegeln. Zur statistischen Auswertbarkeit und Vergleichbarkeit sind standardisierte und reproduzierbare Modelle und Osteosynthesetechniken erforderlich, um zuverlässige Schlussfolgerungen treffen zu können [31]. Solche Modelle sind die Basis wissenschaftlichen Arbeitens.

Bisher benutzte Modelle verwenden v. a. eine intramedulläre Stabilisierung durch einen Marknagel. Hierbei handelt es sich zumeist um einen simplen Draht, welcher in die Markhöhle eingebracht wird, um die Fraktur zu sichern (Abb. 1).

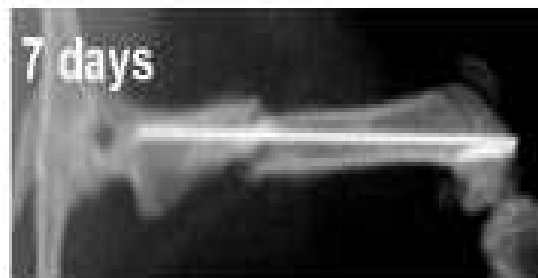


Abbildung 1: Röntgenaufnahme eines frühen intramedullären Frakturmodells nach Manigrasso et al. 7 Tage postoperativ [36]

Zum anderen werden externe Fixateure verwendet. Diese bestehen, vereinfacht dargestellt, aus in den Knochen eingebrachten Pins, die z. B. über einen kleinen Aluminiumblock miteinander verbunden sind [37]. Der Block befindet sich außerhalb des Körpers der Tiere. Die Frakturrenden werden hierdurch stabil zueinander positioniert (Abbildung 2).

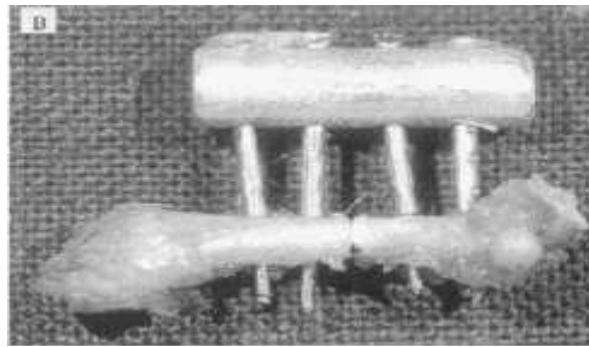


Abbildung 2: Mediale Ansicht eines Mäusefemur mit implantiertem Fixateur externe nach Connolly [37]

Man kann weiterhin unterscheiden zwischen geschlossenen und offenen Frakturmodellen. Bei geschlossenen Modellen wird der zu untersuchende Knochen nicht operativ freigelegt, sondern bei geschlossenem Weichteilmantel gebrochen [38]. Bei offenen Frakturmodellen wird die Fraktur operativ nach Präparation des zu untersuchenden Knochens erzeugt [37]. Der Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, reproduzierbare, genau definierte Frakturen zu erzeugen, beispielsweise durch Osteotomie. Außerdem können beim offenen Modell Manipulationen am Frakturspalt vorgenommen werden, wie zum Beispiel die Entfernung des Periosts oder die Applikation von Substanzen direkt in den Frakturspalt.

Es bietet sich aus wissenschaftlichen Gründen an, Knochen zu untersuchen, die eine gewisse Größe aufweisen. Dies sind bei kleinen Tieren wie der Maus neben Femur noch Tibia und Rippen. Die Rippen eignen sich aber aufgrund ihrer Anatomie nicht für biomechanische Untersuchungen und eine osteosynthetische Versorgung ist hier nicht möglich. Das Femur scheint wegen seines relativ geraden Aufbaus der am besten geeignete Knochen zu sein. Im Vergleich zum Femur hat die Tibia einen gekrümmten Verlauf und wird distalwärts dünner, was das Anbringen von Osteosynthesematerialien erschwert. Des Weiteren wird die Fibula oft mit frakturiert, was eine spätere Auswertung aufgrund eines zweiten Kallus erschweren kann [36, 39].

Bei bisherigen Modellen mit Fixateur externe wurde das hohe Gewicht des Fixateurs in Relation zum Gewicht der Tiere als problematisch angesehen [40]. Ein Gewicht des externen Fixateurs von 7-9g entspricht in etwa 30% des Körpergewichts der Maus. Folge ist eine Störung des physiologischen Gangbilds der Maus und eine erhöhte Belastung der

Extremität. Zudem kann es bei dessen Verwendung zu Pinlösungen und Pininfektionen kommen [41]. Dies ist auf die exponierte Lage des Osteosynthesematerials zurückzuführen. Die Tiere können sich z. B. mit dem Fixateur externe zwischen den Käfigstangen verhaken, und in der Folge kommt es zur Implantatlockerung. Von Vorteil bei diesen Modellen ist die hier jedoch hohe Rotationsstabilität im Vergleich zu bisher verwendeten intramedullären Stabilisierungen mit simplen Drahtstiften [40, 42].

Bei der Verwendung von externen Fixateuren besteht bei speziellen Modellen die Möglichkeit, Kompression im Frakturspalt zu erzeugen oder umgekehrt im Sinne einer Distraction die Frakturende voneinander zu entfernen [43]. So kann im Gegensatz zur Stabilisierung mittels intramedullärem Pin eine Stabilisierung von Segmentdefekten des Knochens erreicht werden.

Das am häufigsten verwendete Frakturmodell ist eine intramedulläre Stabilisierung. Es bietet jedoch weder Rotationsstabilität noch axiale Stabilität [36, 42, 44]. Hier wird lediglich eine Kanüle oder ein Draht intramedullär eingebracht. So sind die distal und proximal vom Frakturspalt gelegenen Knochenanteile nicht rotationsstabil zueinander fixiert [45, 46]. Holstein et al. gelang es, durch Abflachung der distalen und proximalen Enden einer intramedullär eingebrachten Kanüle eine bessere Rotationsstabilität zu erreichen [38]. Aber auch hier wurde keine axiale Stabilität erreicht, und der Zuwachs an Rotationsstabilität war gering. Bei einem weiteren von Holstein et al. entwickelten intramedullären Verfahren, der sog. MouseScrew, konnte eine axiale Stabilisierung der Fraktur erreicht werden. Keines der intramedullären Modelle bietet jedoch die Möglichkeit zur Sicherung der axialen und Rotationsstabilität mit Verriegelungsbolzen, einer Technik, wie sie klinisch bei der Versorgung langer Röhrenknochen beim Menschen standardmäßig Anwendung findet.

Oben genannte Modelle ermöglichen die Untersuchung der normalen ungestörten Frakturheilung, erlauben jedoch nicht die Untersuchung einer gestörten oder ausbleibenden Heilung [23, 47, 48]. Hier sind v. a. Segmentdefektmodelle von Interesse. Das Prinzip dieser Modelle beruht auf der Schaffung eines Frakturspalts, der so groß ist, dass keine Überbauung der Fraktur mehr stattfinden kann [49]. Daneben gibt es weitere Ansätze für Modelle zur gestörten Frakturheilung, die z. B. auf der Entfernung des Periost oder Endosts

[23, 50], der Störung der Blutversorgung [48] oder einer Osteodistraktion basieren [47]. Derzeit gibt es noch kein internes Osteosyntheseverfahren, das die stabile Versorgung von kleinen und großen Segmentdefekten im Femur der Maus ermöglicht.

2.5 Ziele der Arbeit

Ziele dieser Arbeit sind:

1. Die Entwicklung eines intramedullären, verriegelten Nagels für das Mäusefemur entsprechend den bei Menschen verwendeten Verriegelungsmarknägeln. Dieser soll die einfache und reproduzierbare Stabilisierung der Fraktur in Bezug auf Länge, Achse und Rotation gewährleisten und des Weiteren die Stabilisierung von Segmentdefekten ermöglichen.
2. Nach Entwicklung des Verriegelungsmarknagels soll dieser in einem ersten Schritt biomechanisch *ex vivo* getestet und die Implantatsteifigkeit mit bestehenden Osteosyntheseverfahren für Mäuse verglichen werden.
3. In einem nächsten Schritt soll die Frakturheilung *in vivo* unter Verwendung des entwickelten Implantats bei Mäusen untersucht werden.

3 MATERIAL UND METHODIK

3.1 Entwicklung des LockingMouseNail

Der Entwicklung des LockingMouseNail (LMN) erfolgte in Zusammenarbeit mit dem AO Development Institute (Davos, Schweiz). Das Design des LMN wurde anhand von μ -CT-Scans von Femora einer CD1-Maus (Gewicht 35g) am Computer entworfen. Zur Planung des Designs wurde ein Datensatz mit Hilfe eines 3D-CAD-Programms erstellt (Unigraphics NX4, Siemens PLM Software Inc., Siemens AG, München/Deutschland). Nach digitaler Planung wurden dann verschiedene Prototypen des LMN aus Implantatstahl maschinell durch das AO Development Institute (Davos, Schweiz) gefertigt, die anschließend weiter verbessert wurden, bis der LMN schließlich in seiner hier vorgestellten Form vorlag.

3.2 Ex vivo Analyse – Biomechanische Testung der Implantatsteifigkeit

Zur Untersuchung der Stabilität des LMN im Vergleich mit diversen anderen Osteosyntheseverfahren für Mäuse wurde zunächst eine biomechanische ex vivo Analyse durchgeführt. Hierzu wurden die Implantate in osteotomierten Kadaver-Femora von CD-1 Mäusen getestet (n=24). Als Kontrollen dienten nicht osteotomierte gesunde Femora (n=8). Folgende Implantate wurden miteinander verglichen:

- (1) der LockingMouseNail,
- (2) ein konventioneller Pin, der aus einer abgezwickten 24G-Injektionsnadel bestand und
- (3) eine Kontrollgruppe

Um die Torsionssteifigkeit der verschiedenen Implantate zu testen, wurde ein standardisiertes, bereits früher beschriebenes Torsionstestungsverfahren verwendet [51, 52]. Die proximalen und distalen Enden der Femora (n=8 für jede Gruppe) wurden zentriert in Aluminiumzylinder (Innendurchmesser 7mm, Höhe 5mm) belastungsstabil mit Knochenzement (Palacos®, Haereus Kulzer, Hanau/Deutschland) einzementiert und die Zylinder in eine Rotationsmessapparatur eingespannt (FMT-400SL, Alluris GmbH, Freiburg/Deutschland). Anschließend wurden die Knochen exakt parallel zur Drehachse positioniert. Um standardisierte Messbedingungen zu garantieren, wurde bei Einzementierung der Knochen ein Abstand von 5mm zwischen den Zylindern festgelegt.

Die Femora wurden dann unter kontinuierlicher Rotation von $0,42^\circ/\text{s}$ belastet und das resultierende Drehmoment in einem Kraft-Weg Diagramm kontinuierlich aufgezeichnet (FMT-400SL, Alluris GmbH, Freiburg/Deutschland). Die ermittelten Daten wurden in Excell konvertiert (FMI Connect Version 2.02 EU, Alluris GmbH, Freiburg/Deutschland) und die Torsionssteifigkeit aus dem linearen Abschnitt der Kraft-Weg Kurve berechnet (Microsoft Office Excel 2003, Microsoft Corporation, Richmond/USA).

3.3 In vivo Analyse

3.3.1 Tiere und Tierhaltung

Für die in vivo Experimente wurden CD-1 Mäuse mit einem Körpergewicht von $35 \pm 5\text{g}$ verwendet. Die Tierhaltung erfolgte im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes unter klimatisierten Raumbedingungen (Lufttemperatur: $22\text{-}24^\circ\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit ca. 60%) bei zwölfstündigem Tag-Nachtrhythmus. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen gehalten und erhielten Standarddiätfutter in Pelletform (Altromin 1320, Altromin, Lage, Deutschland) sowie Wasser ad libitum.

Alle Tierversuche wurden nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes unter Genehmigung der lokalen Tierschutzbehörde durchgeführt.

3.3.2 Studiendesign

Der Tierversuch wurde von der zuständigen Behörde (Dezernat 5, Saarpfalz-Kreis, 66406 Homburg/Saar) unter dem Aktenzeichen AZ K110-180-07 genehmigt und am Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Insgesamt wurden hierbei 42 Tiere analysiert. Unterteilt waren die Mäuse in sechs Gruppen mit je sieben Tieren. Zwei Gruppen hatten einen Frakturspalt von 2,00mm, wobei eine Gruppe nach zehn Wochen, die andere nach fünf Wochen getötet und analysiert wurde. Weitere zwei Gruppen hatten einen Frakturspalt von 0,25mm. Endpunkte dieser Gruppen waren nach zwei und fünf Wochen. Die übrigen zwei Gruppen hatten einen Frakturspalt von 0,00mm. Dieser wurde durch Kompression der Frakturrenden nach erfolgter Osteotomie erreicht. Endpunkte dieser Gruppen waren ebenfalls nach zwei und fünf Wochen (Abbildung 3). Von allen Tieren wurde postoperativ und post mortem eine Röntgenaufnahme des rechten Hinterbeines durchgeführt (MX-20®Faxitron X-Ray Corporation, Illinois/USA) und diese radiologisch ausgewertet. Die Tötung der Tiere erfolgte durch Genickbruch unter Narkose. Nach Ausbau des rechten und linken Femurs wurden die Implantate entfernt und die Femora der biomechanischen und histologischen Untersuchung zugeführt.

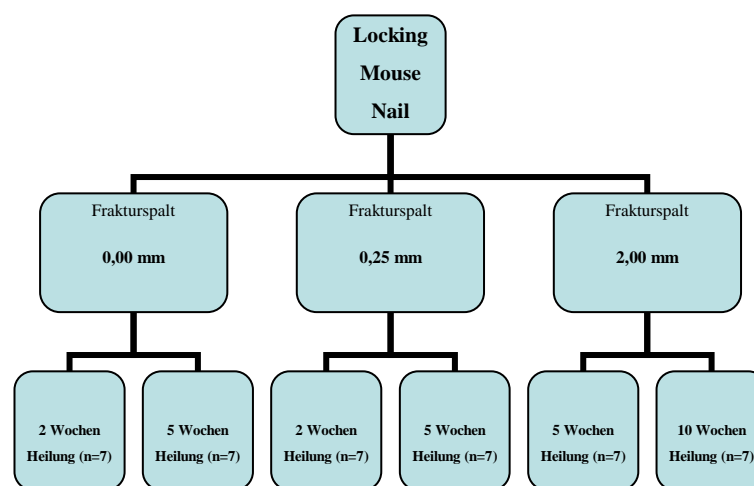


Abbildung 3: Übersicht Studienaufbau mit Darstellung der einzelnen untersuchten Gruppen

3.3.3 Operation und postoperativer Verlauf

In einem ersten Schritt wurde das genaue Gewicht der Tiere mit einer handelsüblichen Haushaltswaage (TCM®, Hamburg/Deutschland) bestimmt.

Nach Bestimmung des Gewichts wurden die Tiere mittels intraperitonealer Injektion narkotisiert. Hierzu wurde ein Gemisch aus Ketamin (Ketanest®, Pfizer Pharma GmbH, Berlin/Deutschland) (75mg/kg), Xylazin (Rompun®, Bayer Health Care, Leverkusen/Deutschland) (25mg/kg) injiziert. Die Tiere wurden mit Zeigefinger und Daumen der einen Hand im Nackenbereich fixiert, der Schwanz des Tieres wurde zwischen Ringfinger oder kleinem Finger und Hypothenar festgehalten. So waren die Tiere gut fixiert, und die Injektion der Narkoselösung konnte mit der anderen Hand kontrolliert und sicher durchgeführt werden. Die Injektionsstelle befand sich im Bereich des Unterbauchs der Tiere, ca. 5mm proximal des Beckens. Durch Kopftieflage der Mäuse bei Injektion wurde der Darm nach proximal verlagert um so das Risiko einer versehentlichen Darmperforation zu verringern. Zwei bis fünf Minuten nach Injektion des Narkotikums bewegten sich die Mäuse nicht mehr und zeigten keine Reaktion auf Schmerzreize, so dass mit dem operativen Prozedere begonnen werden konnte. Zeigten die Tiere im weiteren Verlauf Schmerzzeichen, erfolgte eine Nachdosierung mittels des oben genannten Narkosegemischs.

Nach Narkotisierung der Tiere wurden zunächst die Augen der Mäuse durch Augencreme (Bepanthen Augen- und Nasensalbe®, Bayer Health Care, Leverkusen/Deutschland) bedeckt, um sie so vor Austrocknung zu schützen. Anschließend wurde das Fell der rechten Hinterbeine von der Behaarung befreit. Zuerst wurde ein elektrischer Kurzhaartrimmer verwendet, mit dem ein Großteil der Behaarung entfernt werden konnte. Danach wurden die Hinterbeine mit einem Einwegrasierer nass rasiert, bevor schließlich eine Enthaarungscreme (elcamed® Creme, Asid Bonz GmbH, Herrenberg/Deutschland) aufgetragen wurde, die nach einer Einwirkzeit von drei Minuten mit einem Spatel abgetragen wurde und so die letzten Haare entfernt wurden.

Nach anschließender Reinigung des rechten Hinterbeines mit NaCl-Spüllösung (Ecotainer®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen/Deutschland) wurde präoperativ

5mg/kg KG Carprofen (Rimadyl®, Pfizer Animal Health, Berlin/Deutschland) zur postoperativen Schmerztherapie subcutan in eine Nackenfalte injiziert. Der Operationsbereich wurde mit OP-Tüchern ausgelegt. Tupfer und Wattestäbchen (Funk&Walter GmbH, Merchtwiler/Deutschland) sowie NaCl-Spüllösung (Ecotainer®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen/ Deutschland) zur Spülung des OP-Situs wurden benutzt.

Das Instrumentarium, bestehend aus feinem Nadelhalter und Pinzette, des Weiteren einem Einwegskalpell (Gr. 15), einer Schere, einer gebogenen Klemme sowie einer gebogenen Pinzette, wurde nach entsprechender Desinfektion bereitgelegt. Außerdem wurden ein Eindrehinstrumentarium, ein Seitenschneider sowie eine Gigli-Drahtsäge verwendet. Hinzu kam ein elektrisch betriebener Fräsbohrer (Micromot50®, Proxxon GmbH, Niersbach/Deutschland), ein handgeführter Bohrer (0,3 mm Durchmesser) sowie Nahtmaterial (Prolene® 5/0, Ethicon, Johnson&Johnson Medical GmbH, Norderstedt/Deutschland).

Alle verwendeten Instrumente und Materialien wurden vor Operationsbeginn mit alkoholischer Desinfektionslösung (Softasept®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen/Deutschland) desinfiziert. Bei der Operation wurden Handschuhe (Peha-soft® Powderfree, Paul Hartmann AG, Heidenheim/Deutschland) getragen sowie OP-Oberbekleidung.

Nach Desinfektion des rechten Beines und dreiminütiger Einwirkzeit wurde die Patella durch eine mediale, ca. 4 mm lange Inzision der Haut freigelegt, wofür ein Skalpell (Gr. 15) benutzt wurde. Anschließend wurde die Patella nach Inzision (2-3mm) des medialen Retinakulums nach lateral luxiert. Hierdurch wurde das distale Femur mit interkondylärer Notch freigelegt. Mit einem Fräsbohrer von 0,6mm Durchmesser wurde der Markraum zur Femurlängsachse interkondylär aufgebohrt (Abbildung 5 A).

Dieses Loch wurde in einem zweiten Schritt, nach Überprüfung der korrekten Lage des Bohrkanals, mit einem etwas größeren Bohrer auf den Durchmesser des LMN vergrößert (0,8mm Durchmesser). Darauf folgte das Einbringen einer Kanüle (27G) in den intramedullären Raum des Femurs. Mit Hilfe der Kanüle wurde die proximale Kortikalis des rechten Femurs durchbohrt.

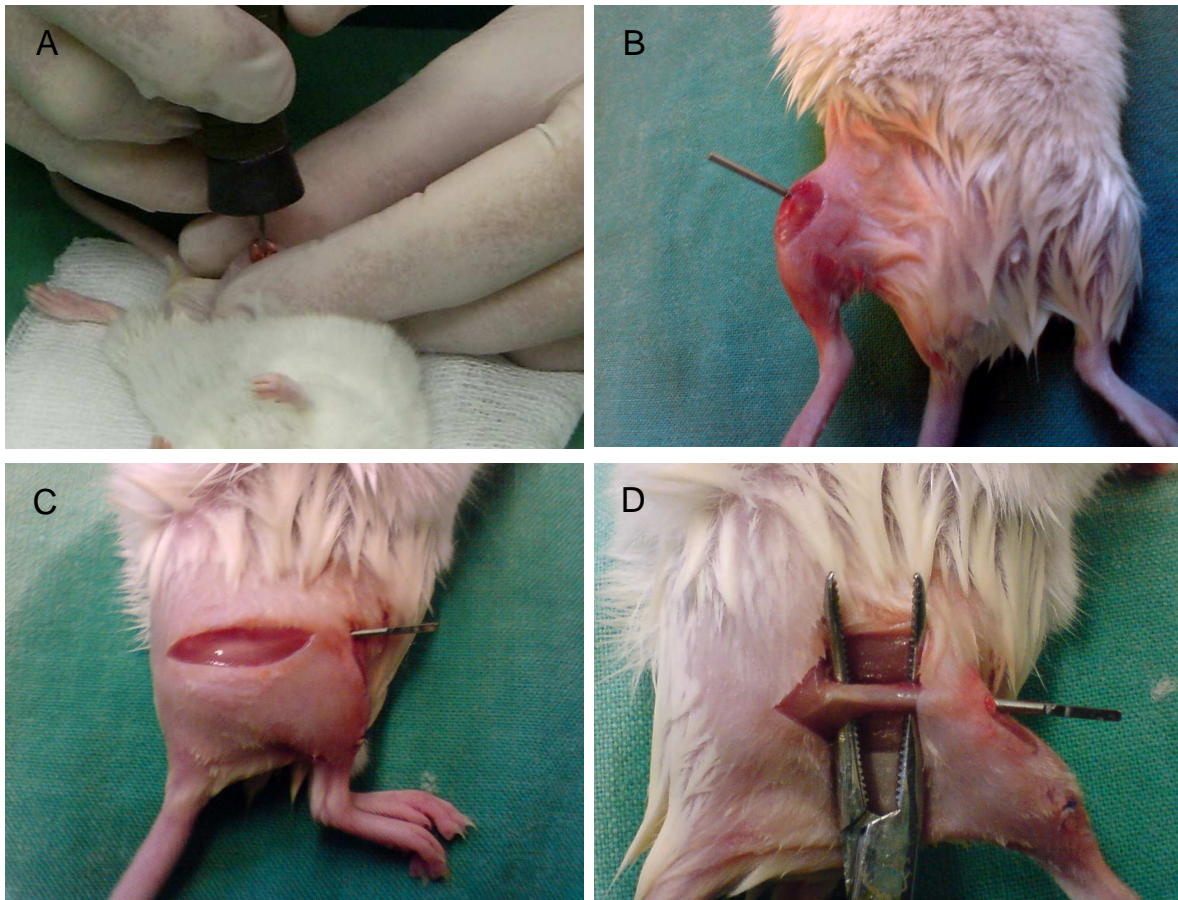
Es folgte der Einbau des intramedullären Nagels. Dieser wurde an seinem distalen Ende in ein Eindrehinstrumentarium eingespannt, welches die Implantation erleichterte. Unter ständigem Drehen wurde der Nagel langsam in den Intramedullarraum eingeführt, wobei sich das am proximalen Ende des Nagels befindliche Gewinde nach und nach in der proximalen Kortikalis des Femurs verankerte.

Der Nagel wurde bis zur sichtbaren Markierung in Form einer zirkulär verlaufenden Einkerbung (ca. 1-3mm von der Knochenoberfläche entfernt) retrograd in den Markraum des Femurs eingebracht (Abbildung 5 B).

Der Verriegelungsnagel wurde so ausgerichtet, dass die im Nagel verlaufenden Bohrkanäle für die Verriegelungspins von ventral nach dorsal verliefen.

Nach Überprüfung der korrekten Lage des Implantats mittels Röntgenkontrolle wurde ein lateraler Zugang zum Femur präpariert. Auf einer Länge von 2cm wurde die Haut in Femurlängsachse inzidiert (Abbildung 5 C).

Anschließend wurde die Faszie vorsichtig geöffnet und durch Verlagerung der den Femur bedeckenden Muskeln der Femur freipräpariert (Abbildung 5 D).



Abbildungen 5 A-D:

(A) Mit dem Fräsbohrer wird die Kortikalis der interkondylären Notch durchbohrt. Eine Hand fixiert hierbei das Hinterbein, die andere führt den Bohrer.

(B) Ansicht von ventral: Der Verriegelungsnagel ist von retrograd in das rechte Femur implantiert.

(C) Ansicht von rechts lateral: Nach Ausführung des Hautschnitts ist das Muskelgewebe mit intermuskulärem Septum zu sehen.

(D) Der Femurknochen ist nun unter Schonung des Periosts freipäpariert.

Als nächster Schritt folgte die Befestigung des Zielgerätes am distalen Nagelende (Abbildung 6 A).

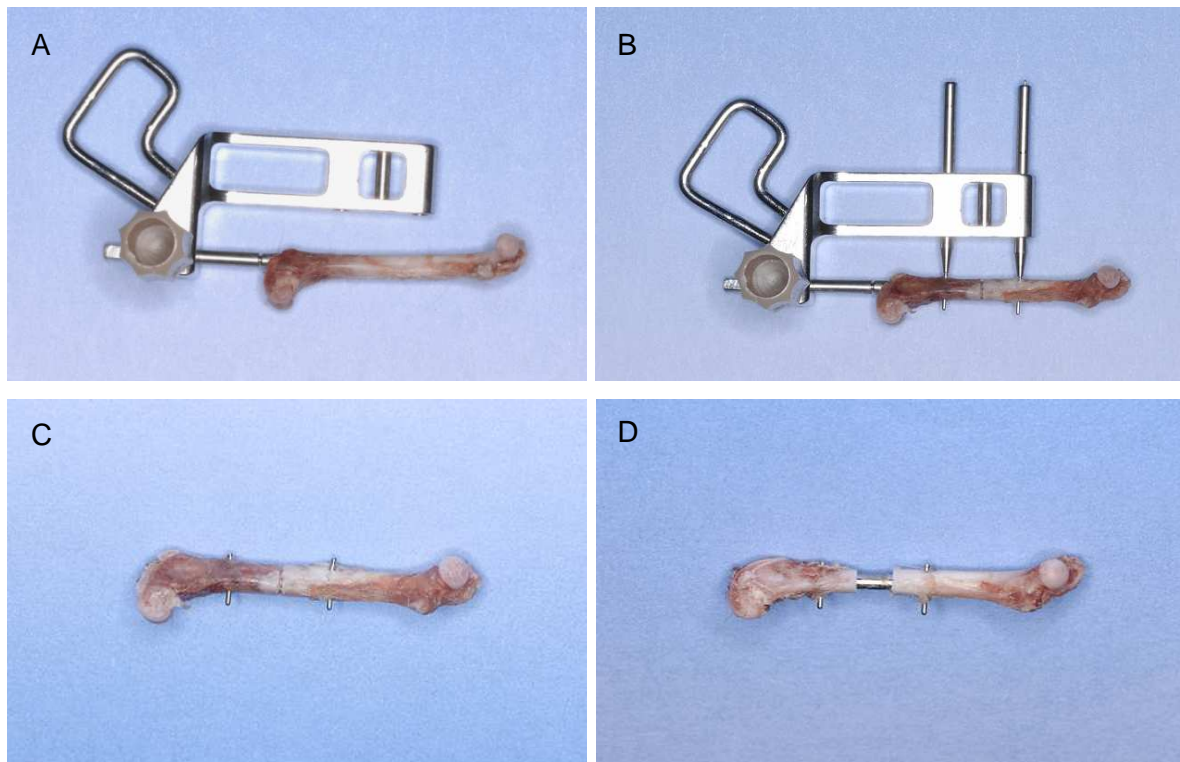
Mit einem dünnen Bohrer (Durchmesser 0,3mm) wurden nun die zwei Bohrungen für die lateralen Verriegelungspins von Hand durchgeführt, wobei der Bohrer durch beide Kortikalices und die bestehende Bohrung im LMN geführt wurde.

Nach Fertigstellung der Bohrung wurden die beiden Pins mit erneuter Führung durch das Zielgerät in den Femur eingebracht und so der LMN verriegelt (Abbildung 6 B).

Bestätigte sich die korrekte Platzierung der Verriegelungspins im Kontroll-Röntgen, wurde in einem nächsten Schritt der Femurknochen senkrecht zur Längsachse osteotomiert. Dies erfolgte mit einer Gigli-Drahtsäge. Durch Verwendung von Sägelehren, die am Zielgerät befestigt werden, konnten standardisierte Osteotomien in der Mitte der beiden Verriegelungspins erzeugt werden.

Eine Sägelehre war für den Frakturspalt von 0,25mm vorgesehen. Bei der Sägelehre für den Frakturspalt von 2mm wurde der Knochen zweimal osteotomiert, und der entstandene Knochenring wurde anschließend mit einer feinen Pinzette entfernt, nachdem er mobilisiert und gebrochen worden war.

Anschließend wurde das Zielgerät entfernt und der aus dem distalen Femur hervorstehende Anteil des LMN mit einem Seitenschneider abgetrennt (Abbildungen 6 C u. D).



Abbildungen 6 A-D (aus Übersichtsgründen sind diese Aufnahmen bei explantiertem Femur angefertigt):

(A) Das Zielgerät ist am LMN angebracht.

(B) Die Verriegelungspins sind mit Führung durch das Zielgerät im LMN und Femur platziert. Die Spitzen der Verriegelungspins treten durch die gegenüberliegenden Kortikalis wieder aus dem Knochen aus.

(C) Blick von medial auf das Femur: Der Frakturspalt von 0,25mm ist zwischen den beiden Verriegelungspins zu sehen. Das distale Ende des LMN ist bereits abgetrennt.

(D) Frakturspalt von 2mm nach Verriegelung der Pins im LMN. Das überstehende Ende des LMN am distalen Femurende (im Bild links) ist bereits abgetrennt.

Nach Spülung des Wundgebiets wurde nun die Muskelfaszie mit einer fortlaufenden Naht genäht. Hierzu wurde Prolene 5/0® (Ethicon, Johnson&Johnson Medical GmbH, Norderstedt/Deutschland) Nahtmaterial verwendet. Die lateralen Muskeln bedeckten dabei das Femur wieder vollständig.

Abschließend wurde die Hautnaht durchgeführt, wobei hier mit Einzelknöpfen genäht wurde. Als Nahtmaterial wurde ebenfalls Prolene 5/0® (Ethicon, Johnson&Johnson Medical GmbH, Norderstedt/Deutschland) verwendet.

Nach Wundverschluss des lateralen Zugangs wurde anschließend die Patella reponiert und mit einer Einzelknopfnahse medial fixiert, wobei ebenso wie bei der Hautnahse medial des Kniegelenks Prolene 5/0® (Ethicon, Johnson&Johnson Medical GmbH, Norderstedt/Deutschland) verwendet wurde.

Vor dem Erwachen der Mäuse erfolgte als letzter Schritt eine abschließende Röntgenkontrolle des rechten Hinterbeines.

Nach Beendigung der Operation wurden die Tiere in einen Einzelkäfig gelegt und mit einer Infrarotlampe bestrahlt, um eine Auskühlung bis zum Erwachen aus der Narkose zu verhindern.

Erst nachdem die Tiere unter Infrarotbestrahlung wieder erwacht waren, wurden sie vom OP-Bereich in den Karantänebereich des Instituts für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes transportiert. Die operierten Beine wurden sofort nach Operationsende voll belastet.

Nach 24 und 48h wurde den operierten Mäusen erneut jeweils 0,05ml einer Injektionslösung mit 5mg/kg KG Carprofen (Rimadyl®, Pfizer Animal Health, Berlin/Deutschland) subcutan zur Analgesierung in die Nackenfalte injiziert. Die Operationsnarbe sowie der Allgemeinzustand der Tiere wurden täglich überprüft.

Nach Ablauf des gruppenspezifischen Analysezeitraums wurden die Tiere mittels Genickbruch getötet und die linken sowie die rechten Femora unmittelbar entnommen.

Hierzu wurden die Femora im Hüftgelenk sowie im Kniegelenk exartikuliert und aus den Kadavern entfernt. Bei vorsichtigem Vorgehen unter Bewahrung der Integrität des Frakturbereichs wurden die umgebenden Weichteilreste reseziert.

Nach Abschluss der Präparation wurden dann zunächst die Verriegelungspins aus dem Knochen entfernt.

Hierzu wurden die an der dorsalen Femurfläche herausragenden Pinsenden in einen kleinen Nadelhalter geklemmt. Anschließend wurden sie entgegen ihrer Implantationsrichtung unter leichter Rotationsbewegung aus dem Knochen geschoben, so dass sie an der ventralen Femuroberfläche aus dem Knochen austraten und entfernt werden konnten.

Nach erfolgreicher Entfernung beider Verriegelungspins konnte mit dem Ausbau des intramedullären Nagels begonnen werden.

Hierzu wurde das distale Ende des LMN, das etwas aus der interkondylären Notch des Femurs herausragte, in eine Drehhilfe eingespannt. War dies aufgrund zu geringen Überstandes des LMN nicht gut möglich, wurden geringe Anteile des distalen Femurs reseziert, um so das Ende des LMN besser erreichen zu können.

Nach erfolgtem Einspannen des LMN wurde er unter vorsichtigen, gegen den Uhrzeigersinn gerichteten Drehungen aus dem Femur entfernt.

3.3.4 Beurteilung der Frakturheilung

Die Beurteilung der Frakturheilung nach Ende des Beobachtungszeitraums erfolgte durch:

1. Radiologische Untersuchung
2. Biomechanische Untersuchung
3. Histologische Untersuchung

3.3.4.1 Radiologische Untersuchung

Direkt nach Tötung der Mäuse wurden digitale Röntgenaufnahmen der rechten Hinterbeine angefertigt. Dies erfolgte noch vor der Präparation der Femora.

Für die Aufnahmen wurden die Femora im seitlichen Strahlengang geröntgt. Die Belichtungszeit betrug 10 Sekunden bei einer Röhrenspannung von 26kV.

Für die Aufnahmen wurde das digitale Labor-Radiographiesystem MX-20 der Firma Faxitron (MX-20®Faxitron X-Ray Corporation, Illinois/USA) verwendet. Es handelt sich um ein so genanntes Röntgenvollschutzgerät, das während der Anwendung keine Strahlung in gesundheitsgefährdenden Dosen an die Umgebung abgibt (der in Deutschland vorgeschriebene Grenzwert von $7,5\mu\text{Si/h}$ im Abstand von 10cm wird weit unterschritten).

Zur Untersuchung wurden die Tiere in das Gerät gelegt. Zur genauen Positionierung der Tiere zum Röntgenstrahl diente ein System aus zwei Laserstrahlen, in deren Schnittpunkt die Femora der Mäuse positioniert wurden.

Erst nach Schluss der Sicherheitstüre des Röntgengerätes konnten die Aufnahmen angefertigt werden.

Alle Aufnahmen wurden im TIFF-Format digital gespeichert. Die Auswertung der digitalen Röntgenaufnahmen erfolgte unter Verwendung des Grafikprogramms Image J (ImageJ Analysis System, NIH, Bethesda/USA). Hier wurde der Kallusdurchmesser [mm] sowie der Femurdurchmesser [mm] bestimmt. Als Zielwert wurde mittels Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond/USA) das Verhältnis von Kallusdurchmesser zu Femurdurchmesser berechnet. Zur Beurteilung der knöchernen Überbrückung der Osteotomie wurde der Goldberg-Score verwendet [53]. Hier wurden den Femora bei fehlender Überbrückung 0 Punkte zugeordnet. Bei an Hand der Röntgenbilder nicht definitiv feststellbarer Heilung wurde ein Punktwert von 1 zugeordnet, bei radiologisch eindeutiger Heilung ein Punktwert von 2.

3.3.4.2 Biomechanische Untersuchung

Im Anschluss an die radiologische Untersuchung erfolgte die Präparation des rechten sowie des linken Femur, welche sofort biomechanisch untersucht wurden. Vor Beginn der Testung wurden die Bestandteile des LMN sorgfältig entfernt, ohne die Strukturen des Knochens in der Frakturzone zu beschädigen.

Jedes Femur (rechtes und linkes) wurde einem 3-Punkt-Biegungstest unterzogen. Diese Untersuchung wurde mit einer Materialtestungsmaschine (Zwicki BZ 2.5/TS1S®, Zwick GmbH & Co. KG, Ulm/Deutschland) durchgeführt.

Die Knochen wurden hierzu beidseits frei aufliegend auf eine Halterung mit einem Abstand der beiden Auflagepunkte von 6mm platziert. Die Femora wurden so auf der Unterlage angebracht, dass sich der mittig diaphysär gelegene Frakturbereich genau in der Mitte zwischen den Auflagepunkten befand.

Auf eben diese Stelle wurde dann von oben mittels eines in vertikaler Richtung beweglichen Stempels eine Kraft auf die Knochen ausgeübt (Abbildung 7).

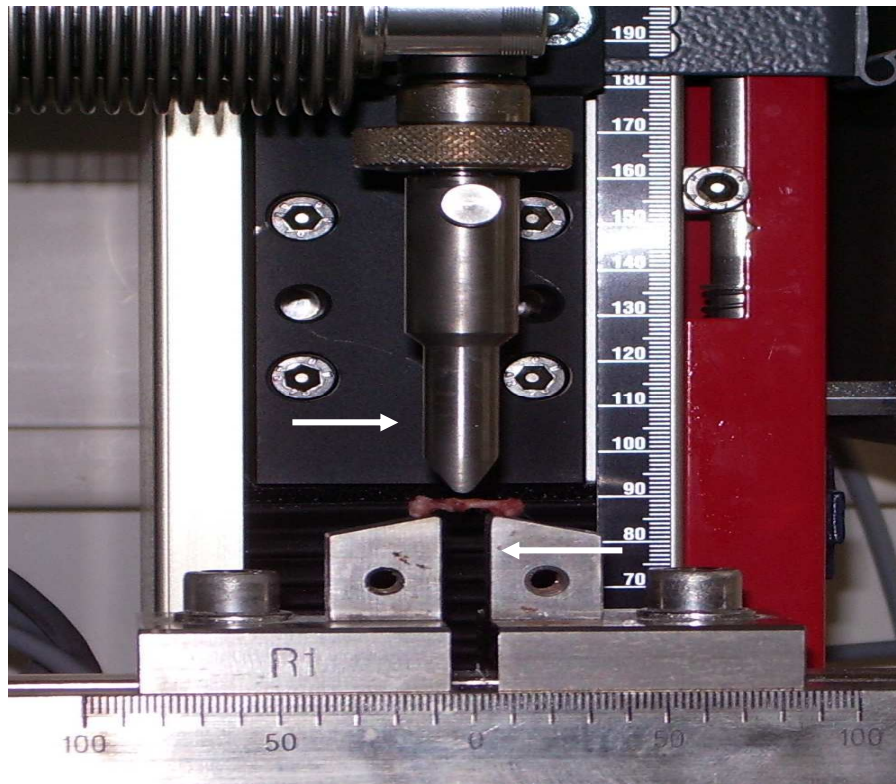


Abbildung 7: Darstellung der Testmaschine. Der linke Pfeil zeigt auf den Kraftstempel. Der rechte Pfeil deutet auf die Lücke der Auflage, die vom Femurknochen überbrückt wird.

Der Kraftstempel bewegte sich mit einem konstanten Vorschub von 1mm/min auf den Knochen.

Gemessen wurde hierbei die resultierende Kraft, und das resultierende Kraft-Weg Diagramm wurde aufgezeichnet. Die Messung erfolgte zerstörungsfrei, wobei der Messvorgang im linearen Teil des Kraft-Weg-Diagramms vor Frakturierung gestoppt wurde.

Während der gesamten Zeit zwischen Ausbau und Testung wurden die Knochen mit NaCl-Spüllösung feucht gehalten, um eine mögliche Verfälschung der Werte durch Austrocknung der Knochen zu verhindern.

Als Parameter zur Beurteilung der Frakturheilung wurde die Biegesteifigkeit der Femora bestimmt. Die Biegesteifigkeit der untersuchten Knochen wurde definiert als die Verformbarkeit der Knochen in Millimetern (mm) je ausgeübter Kraft in Newton (N) und wurde aus dem ersten linearen Bereich des Kraft-Weg-Diagramms als Steigung abgelesen [N/mm].

Zur Normalisierung der Werte wurde die Steifigkeit der rechten, frakturierten Femora in Prozent zur Steigung der linken, gesunden Femora angegeben.

3.3.4.3 Histologische Untersuchung

Zur histologischen Untersuchung wurden die rechten Oberschenkelknochen aller Tiere unmittelbar nach der mechanischen Knochentestung zunächst für 24 Stunden in Zinklösung (IHC Zinc Fixative® BD Biosciences, San Jose/USA) fixiert. Anschließend wurden sie für vier Wochen bei 4°C in zehnprozentiger Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA) zur Entkalkung gelagert.

Die entkalkten Knochen wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils eine Stunde mit 70 %, 80 %, 90 %, sowie viermal eine Stunde mit 100 % Alkohol) entwässert. Im Anschluss wurden die Proben dreimal für jeweils eine Stunde mit Xylol behandelt, um das Gewebe paraffingängig zu machen. Abschließend wurden die Proben über den Zeitraum von einer Stunde in heißem Paraffin eingebettet.

Im weiteren Verlauf wurden mit einem Schlittenmikrotom (Leica SM 2000R, Leica Microsystems, Wetzlar/Deutschland) 5µm dicke Schnittpräparate im Bereich des maximalen Kallusdurchmessers in sagittal-longitudinaler Schnittführung angefertigt und nach der Masson-Goldner-Methode gefärbt. Hierzu wurden die Proben zunächst 1-2 Minuten in Weigerts Eisenhämatoxylin gefärbt, 10-15 Minuten unter fließendem Wasser gespült und anschließend weitere 5-7 Minuten in Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin gefärbt. Nach Spülung mit 1% Essigsäure erfolgte die Behandlung mit Molybdätophosphorsäure-Orange bzw. Wolframatophosphorsäure-Orange bis zur völligen Entfärbung des Bindegewebes. Nach erneuter Spülung mit 1% Essigsäure wurden die

Präparate mit Lichtgrün für fünf Minuten gegengefärbt und abschließend mit 1% Essigsäure für 5 Minuten ausgewaschen sowie in Isopropanol entwässert.

Zur Auswertung der Präparate wurden die histologischen Schnitte unter 1,25-facher Vergrößerung (Olympus BX60 Microscope® Olympus, Tokio/Japan) digitalisiert (Zeiss Axio Cam and Axio Vision 3.1, ®Carl Zeiss, Oberkochen/Deutschland) und mit Hilfe eines Bildauswertungsprogramms analysiert (ImageJ Analysis System® NIH, Bethesda/USA).

Folgende Parameter wurden bestimmt (siehe auch Abbildung 8):

1. Durchmesser Kallus [mm]
2. Durchmesser Femur [mm]
3. Breite Frakturspalt dorsal [mm]
4. Breite Frakturspalt ventral [mm]
5. Periostale Kallusfläche gesamt [mm²]
6. Fläche des knöchernen Anteils innerhalb des periostalen Kallus [mm²]
7. Fläche des knorpeligen Anteils innerhalb des periostalen Kallus [mm²]
8. Fläche des bindegewebigen Anteils des periostalen Kallus [mm²]
9. Punktwert für Heilung (ventraler und dorsaler Spalt je 2 Punkte für eine knöcherne Überbrückung des Frakturspalts, je 1 Punkt für eine knorpelige Überbrückung und 0 Punkte für eine bindegewebige Überbrückung des Frakturspalts) [27]

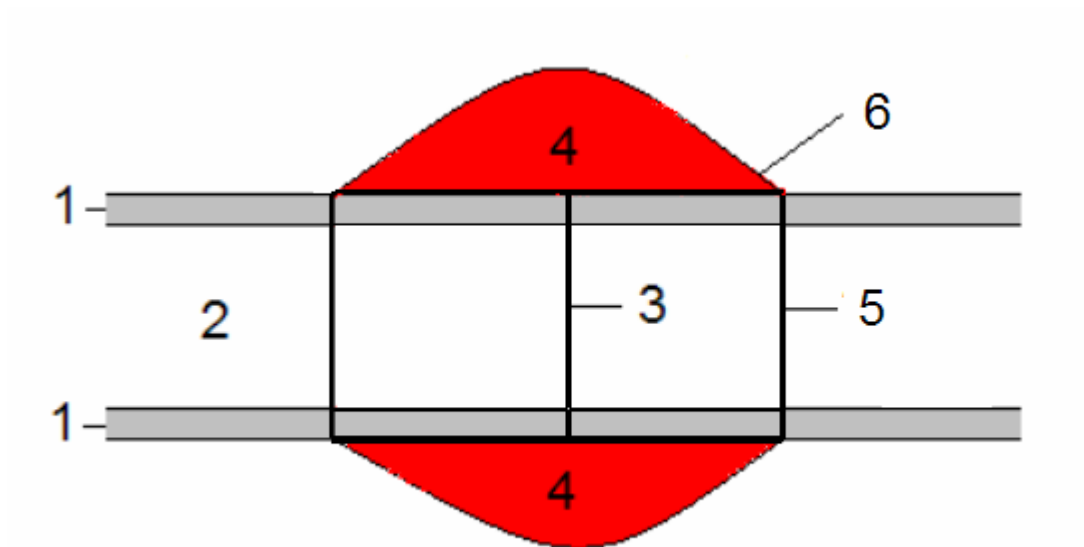


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Auswertungsparameter: 1 = Kortikalis, 2 = Markhöhle, 3 = Frakturspalt, 4 = periostaler Kallus, 5 = Femurdurchmesser, 6 = Kallusfläche

Als Zielwerte wurden gemäß den Empfehlungen der American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) [54] folgende Parameter berechnet:

1. Kallusfläche / Femurdurchmesser [mm]
2. Kallusdurchmesser / Femurdurchmesser [%]
3. Knöcherne Kallusfläche / Kallusfläche [%]
4. Knorpelige Kallusfläche / Kallusfläche [%]
5. Bindegewebige Kallusfläche / Kallusfläche [%]

3.4 Statistik

Alle statistischen Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler (MW \pm SF) angegeben. Vergleiche zwischen den Studiengruppen wurden mit Hilfe der einfachen ANOVA-Analyse sowie dem Newman-Keuls-Test als Post-Test durchgeführt. Um signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Werten anzuzeigen, wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt.

Zur Speicherung und Archivierung der ermittelten Daten sowie einfacher Berechnungen wurde das Programm Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond/USA) verwendet.

Die statistische Auswertung und Erstellung der Graphen erfolgte mittels des Statistikprogramms GraphPad Prism Version 4.00 (GraphPad Prism Software® San Diego/USA).

4 ERGEBNISSE

4.1 Der LockingMouseNail

Der LMN wurde wie folgt entwickelt und gebaut: Das System des LMN besteht aus einem intramedullären Marknagel und zwei Verriegelungspins sowie einem speziell entwickelten Zielgerät, das mit einer Feststellschraube am LMN fixiert wird.

Dazu kommen zwei verschiedene Sägelehren, eine für einen Frakturspalt von 0,25mm, die andere für einen Frakturspalt von 2mm (Abb. 9 A u. B).

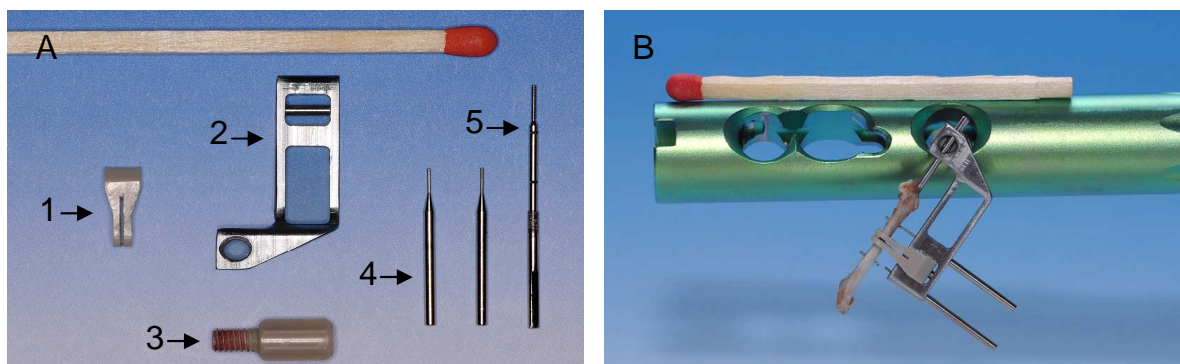


Abbildung 9 A und B:

(A) Darstellung der Bestandteile (1-5) des LMN-Systems im Größenvergleich mit einem Streichholz:

(1) Sägelehre 0,25mm, (2) Zielgerät, (3) Feststellschraube, (4) Verriegelungspins, (5) Marknagel

(B) Implantierter LMN im Größenvergleich mit einem Humerusmarknagel für Menschen sowie mit einem Streichholz

Der LMN hat einen Durchmesser von ca. 0,8mm und an seiner Spitze ein Gewinde (Durchmesser 0,6mm) zur Verankerung im Trochantermassiv der Maus. Des Weiteren kann durch das Vorliegen des Gewindes eine Kompression der beiden Frakturenden zueinander erreicht werden, indem nach vollständiger Fraktur des Femurs der LMN mit drei bis vier Umdrehungen weiter in die Kortikalis im Trochanterbereich getrieben wird.

Auf diese Weise werden die Frakturrenden einander angenähert, und man kann, wenn gewünscht, eine Kompression der beiden Knochenenden aufeinander ausüben.

Senkrecht zu seiner Achse sind in der Mitte des Nagels im Abstand von 0,5cm zwei Bohrungen eingebracht mit einem Durchmesser von 0,3mm. Diese sind für die Verriegelungspins (Durchmesser 0,3mm) vorgesehen.

An seinem distalen Ende hat der LMN auf einer Länge von ca. 5mm eine abgeflachte Seite. Durch diese Modifikation lässt sich das Zielgerät genau auf den Marknagel aufbringen. Es kann nur bis zum Ende der abgeflachten Seite des LMN in Richtung Nagelspitze geschoben werden. So wird die richtige Position des Zielgeräts in Bezug zu LMN und Femur garantiert (Abb. 10 A u. B).

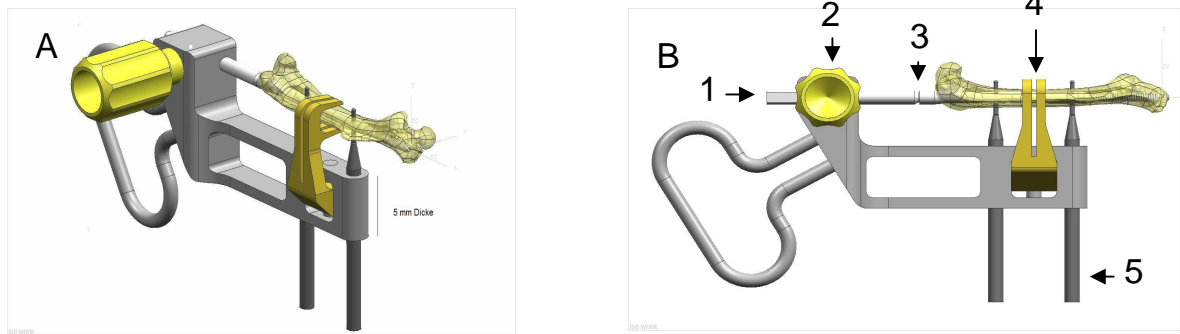
Die Verriegelungspins haben einen Durchmesser von ca. 0,3mm und weisen eine Sollbruchstelle auf. Diese befindet sich am Übergang zwischen dünnem und dicken Teil des Verriegelungspins. Die Verriegelungspins können mit Hilfe des Zielgerätes genau an den Stellen in den Knochen eingebracht werden, an denen sich auch die Bohrungen im LMN befinden. Dies ist wichtig, da die Bohrungen nach Einbringen des LMN in den Mäusefemur für den Operateur nicht mehr sichtbar sind.

Bei korrektem Sitz der Verriegelungspins brechen diese ab einem gewissen Drehmoment an der oben beschriebenen Sollbruchstelle, so dass der dickere Teil der Pins entfernt werden kann (Abb. 10 A).

Das Zielgerät besteht aus einem L-förmigen Arm und einer Feststellschraube aus Plastik. Zur Fixierung des Zielgeräts am LMN weist das Zielgerät an seinem kurzen Schenkel eine Öffnung auf, die über den distalen Anteil des LMN geschoben werden kann.

Am langen Schenkel des Zielgerätes befinden sich zwei Bohrungen im Abstand von 5mm. Diese verlaufen senkrecht zur Achse des langen Schenkels des Zielgerätes. Durch diese Öffnungen werden der Bohrer und anschließend die Verriegelungspins an den LMN geführt. Durch die oben geschilderte exakte Positionierung des Zielgeräts in Beziehung zum LMN verlaufen die Bohrungen im Zielgerät in genauer Verlängerung zu den oben beschriebenen Bohrungen im LMN. So kann der Bohrer, nachdem er durch die Kortikalis an der dem Zielgerät zugewandten Seite gedrungen ist, durch die Öffnung im LMN

gelangen, um dann auf der gegenüberliegenden Seite des Femur wieder durch die Kortikalis zu treten. Auf diese Weise wird ein Kanal für die Verriegelungspins geschaffen, die anschließend nur noch in die Bohrkanäle eingedreht werden müssen (Abb. 10 B).



Abbildungen 10 A und B:

(A) LockingMouseNail (LMN) mit Implantationsinstrumentarium. Die Verriegelungspins sind in das Femur eingebracht. Die Dicke des Zielgerätes (5mm) ist in der Abbildung markiert. Das C-förmige Ende der Sägelehre umgibt das Femur. Der Führungsspalt für die Gigly-Drahtsäge verläuft durch den gesamten knochennahen Anteil der Sägelehre. Hier ist die Sägelehre für den 0,25mm-Defekt abgebildet.

(B) Komponenten des LMN: 1= Abgeflachtes distales Ende d. Marknagels ($\varnothing=0,8\text{mm}$), 2=Feststellschraube, 3=distales Ende des Marknagels, 4= Sägeschablone, 5= Verriegelungspin ($\varnothing 0,3\text{mm}$)

Die beiden Sägelehren bestehen aus Kunststoff. Beide haben an einem Ende eine Einkerbung zur stabilen Befestigung am Zielgerät.

Die beiden Sägelehren unterscheiden sich an dem Ende, das sich femurnah befindet. Bei der Sägelehre, mit der ein Frakturspalt von 0,25mm geschaffen wird, besteht nur ein Führungsspalt für die Gigli-Drahtsäge. Bei der Sägelehre, die für einen Frakturspalt von 2,00mm vorgesehen ist, bestehen zwei Spalte, durch die eine Führung der Gigli-Säge bewirkt wird, wobei der Abstand zwischen beiden Spalten 2,00mm beträgt.

Die knochennahen Enden der Sägelehren haben bei beiden Sägelehrentypen eine C-Form, wodurch das Femur umgriffen wird. Auf diese Weise besteht die Möglichkeit, die Gigli-Säge exakt um den Knochen zu führen und so eine standardisierte Osteotomie durchzuführen (Abb. 10 A u. B).

4.2 Ex vivo Analyse

Die biomechanische Analyse ergab eine signifikant größere Torsionssteifigkeit für den LMN verglichen mit dem konventionellen intramedullären Pin (Abbildung 11). Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied der Torsionssteifigkeit zwischen dem LMN und dem unfrakturiertem Femur. Lediglich bei 5° und 25° im Rotationsversuch zeigte der unfrakturierte Femur eine größere Steifigkeit als der LMN (Abbildung 11).

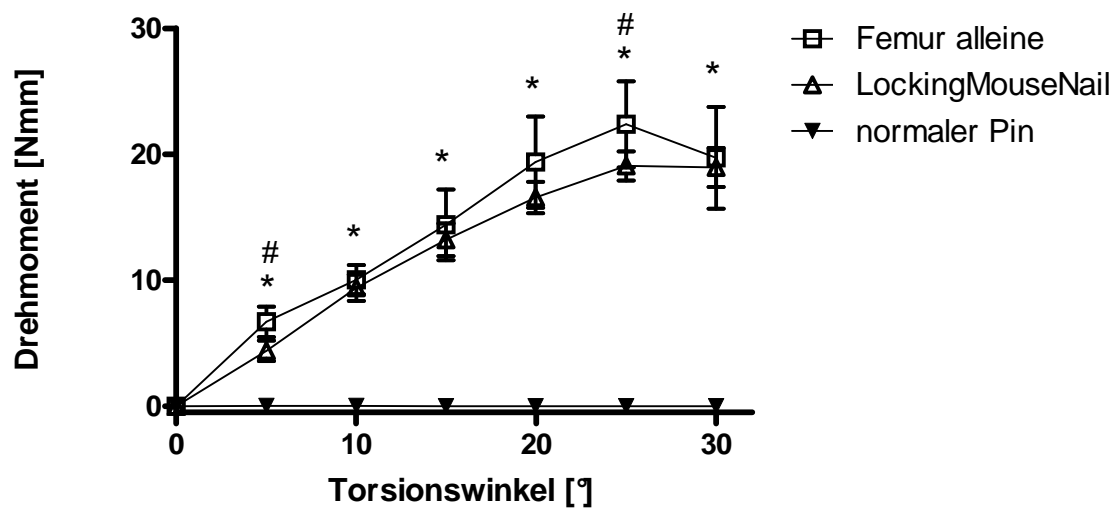


Abbildung 11: Ex vivo Analyse der biomechanischen Steifigkeit verschiedener Implantatsysteme für das Femur der Maus. Im Diagramm ist das Drehmoment gegen den Torsionswinkel aufgetragen. Der LockingMouseNail zeigt im Vergleich zu einem üblichen intramedullären Pin eine signifikant höhere Rotationsstabilität (MW±SF, # $p < 0,05$ LockingMouseNail vs. Femur alleine, * $p < 0,05$ LockingMouseNail vs. intramedullärer Pin).

4.3 In vivo Analyse

4.3.1 Postoperativer klinischer Verlauf

Die operierten Tiere belasteten direkt postoperativ das operierte rechte Hinterbein, wobei nach ca. zwei bis drei Tagen die Aufbelastung nahezu vollständig vollzogen und ein normales Gangbild erreicht war. Die Mäuse zeigten im weiteren Verlauf einen normalen Bewegungsablauf ohne hinkendes Gangbild.

Bei der nach Tötung der Tiere durchgeführten Messung des Körpergewichts zeigte sich sowohl nach zwei, fünf und zehn Wochen keine signifikante Gewichtsab- oder zunahme (Abbildung 12).

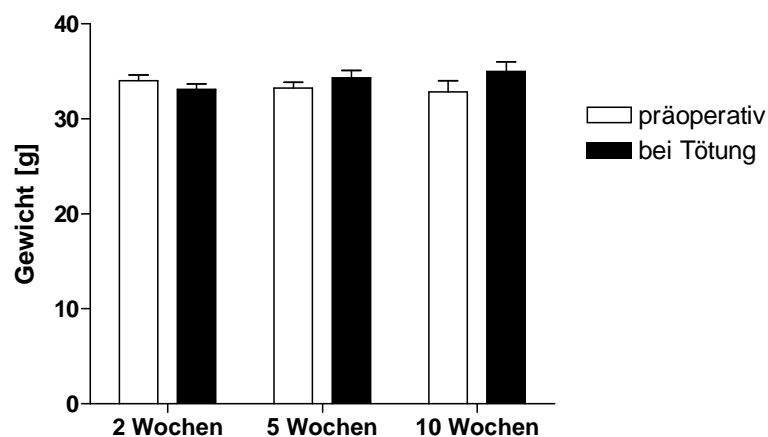


Abbildung 12: Darstellung der Entwicklung des Gewichts der untersuchten Mäuse zu den unterschiedlichen Untersuchungszeiträumen ($MW \pm SF$)

Aus der Studie ausgeschlossen wurden Tiere, bei denen es zu Lösungen der Verriegelungspins kam.

Bei 4 der 42 operierten Tiere kam es zu Pinlösungen, was einer Komplikationsrate von 9,5% entspricht. Im Verlauf trat lediglich ein Fall eines infizierten Knochens auf, was einer Infektionsrate von 2,4% entspricht.

Aufgrund der Ausfallrate wurden letztlich 37 Tiere in die weitere Auswertung eingeschlossen (Abbildung 13).

Gruppe	0,00 mm 2 Wochen	0,00 mm 5 Wochen	0,25 mm 2 Wochen	0,25 mm 5 Wochen	2,00 mm 5 Wochen	2,00 mm 10 Wochen
N	7	6	5	7	6	6

Abbildung 13: Auflistung der in die Auswertung eingegangenen Tiere

4.3.2 Ergebnisse der radiologischen Auswertung

Nach zwei Wochen wiesen Tiere mit 0,00mm Spaltgröße einen Goldberg-Score von $0,5 \pm 0,22$ auf, Tiere mit einem Frakturspalt von 0,25mm einen Score von $0,5 \pm 0,29$. Nach fünf Wochen waren die Knochen von Tieren mit Spaltgrößen von 0,00mm und 0,25mm radiologisch geheilt. Dies zeigte sich in einem Goldberg-Score von 2 ± 0 in beiden Gruppen. Dieser Wert war signifikant höher ($p < 0,001$) als zu allen anderen Zeitpunkten. Mäuse mit einem Frakturspalt von 2,00mm zeigten dagegen nach fünf Wochen keine Anzeichen einer knöchernen Frakturheilung und erreichten lediglich einen Goldberg-Score von $0,17 \pm 0,17$. Auch nach zehn Wochen zeigten Tiere mit einer Spaltbreite von 2,00mm keine knöchernen Heilung und präsentierten sich als atrophe Pseudarthrosen, mit einem Goldberg-Score von 0 ± 0 (Abb. 14 u. 15 A-F).

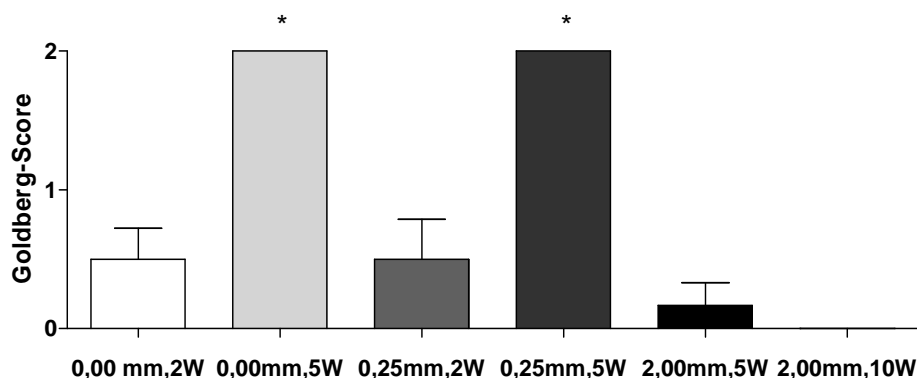
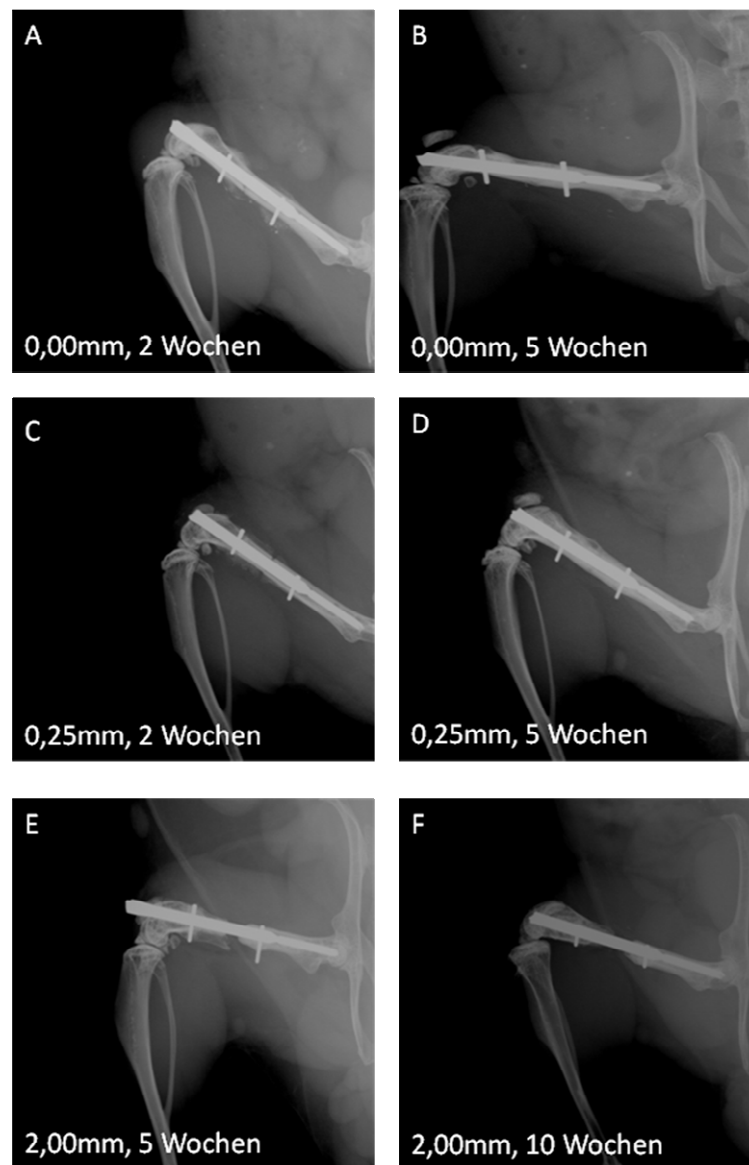


Abbildung 14: Radiologische Auswertung der Frakturheilung anhand des Goldberg-Scores[53] (MW ± SF, * $p < 0,05$ v.s. 0,00mm (2 Wo.), 0,25mm (2 Wo.), 2,00mm (5 Wo.), 2,00mm (10 Wo.))



Abbildungen 15 A-F: Repräsentative Röntgenaufnahmen der operierten Oberschenkelknochen zum Ende des jeweiligen Untersuchungszeitraums vor Tötung der Tiere

Zwei Wochen postoperativ zeigte sich bei Tieren mit einem Frakturspalt von 0,00mm kein signifikanter Unterschied der relativen Kallusgröße verglichen mit Tieren mit einem Frakturspalt von 0,25mm ($113,1 \pm 8,47\%$ vs. $130,7 \pm 20,43\%$, n. s.). Nach fünf Wochen zeigte sich radiologisch keine Änderung der Kallusgröße in den Gruppen mit Spaltgrößen von 0,00mm und 0,25mm ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Auch in der Gruppe mit einer Spaltgröße von 2,00mm fand sich nach fünf Wochen eine mit den beiden anderen Gruppen (0,00mm und 0,25mm) vergleichbare

radiologische Kallusbildung, während nach zehn Wochen kein radiologisch erkennbarer Kallus mehr nachweisbar war (Abbildung 16).

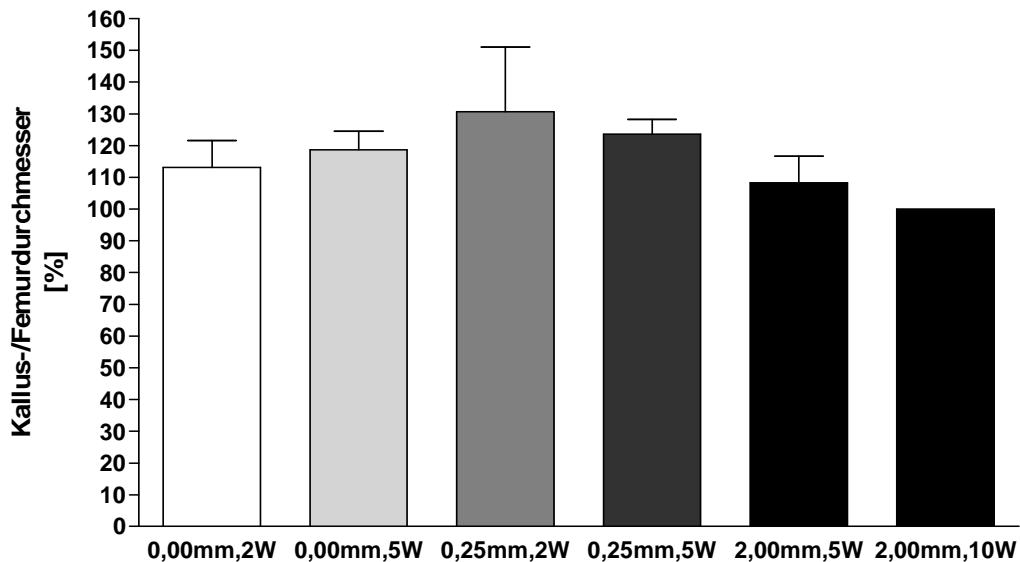


Abbildung 16: Graphische Darstellung des relativen radiologischen Kallusdurchmessers mit Mittelwert und Standardfehler. Auf der Abszisse sind die untersuchten Gruppen der Studie aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Quotienten aus Kallusdurchmesser/Femurdurchmesser in Prozent aufgetragen.

4.3.3 Ergebnisse der biomechanischen Auswertung

Nach zwei Wochen fand sich sowohl bei einer Spaltgröße von 0,00mm als auch bei einer Spaltgröße von 0,25mm eine sehr geringe mechanische Steifigkeit der heilenden Femora ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. ($0,28 \pm 0,15\%$ vs. $0,56 \pm 0,33\%$; n. s.). Fünf Wochen postoperativ kam es zu einem signifikanten Anstieg der Steifigkeit in den beiden Gruppen, welche jedoch untereinander nicht differierte ($72,24 \pm 12,56\%$ bzw. $62,61 \pm 13,43\%$).

Tiere mit einem Frakturspalt von 2,00mm wiesen nach fünf Wochen eine sehr geringe Steifigkeit auf ($0,46 \pm 0,30\%$), welche signifikant geringer war als bei Tieren mit Spaltbreiten von 0,00mm und 0,25mm. Auch nach zehn Wochen zeigte sich bei Tieren mit einem Frakturspalt von 2,00mm biomechanisch eine ausbleibende Frakturheilung mit einer

nicht messbaren Steifigkeit von $0,00 \pm 0,00\%$ im Vergleich zum gesunden linken Femur (Abbildung 17).

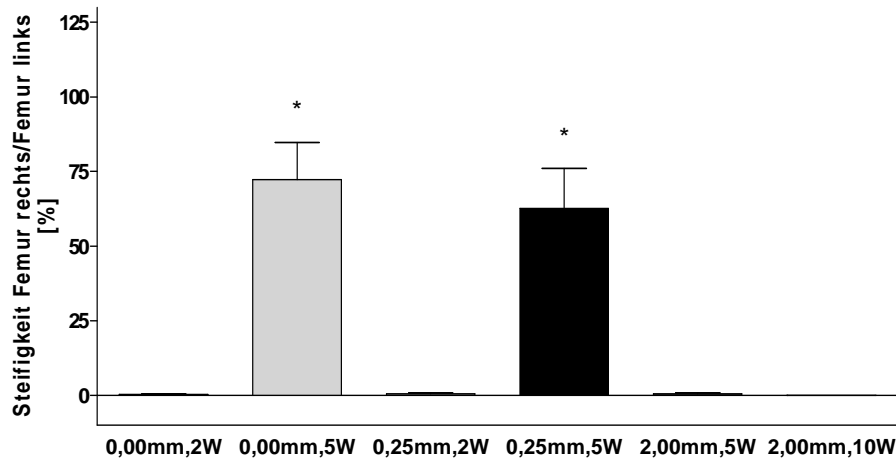


Abbildung 17: Graphik der biomechanischen Testung mittels Dreipunkt-Biegung. Die Biegesteifigkeit der osteotomierten Femora ist im Verhältnis zu den kontralateralen gesunden Femora in Prozent angegeben ($MW \pm SF$, * $p < 0,001$ vs. 0,00mm (2 Wo.), 0,25mm (2 Wo.), 2,00mm (5 Wo.) und 2,00mm (10 Wo.)).

4.3.4 Ergebnisse der histologischen Auswertung

Histologisch zeigte sich in allen Gruppen das Bild einer sekundären Frakturheilung mit periostaler Kallusbildung. Die Kallusbildung war zwei Wochen postoperativ am größten ausgeprägt. Hier zeigten Tiere mit einer Spaltgröße von 0,25mm eine signifikant größere Kallusfläche als Tiere aller anderen Gruppen. Nach fünf Wochen kam es bei Tieren mit Spaltgrößen von 0,00mm und 0,25mm zu einer signifikanten Abnahme der Kallusfläche. Tiere mit einer Spaltgröße von 2,00mm zeigten nach fünf Wochen noch eine vergleichbare Kallusfläche wie Tiere mit den kleineren Spaltbreiten von 0,00mm und 0,25mm zum entsprechenden Zeitpunkt. Nach zehn Wochen kam es dann auch bei Tieren mit einer Spaltgröße von 2,00mm zu einer Reduktion der Kallusfläche (Abbildung 18).

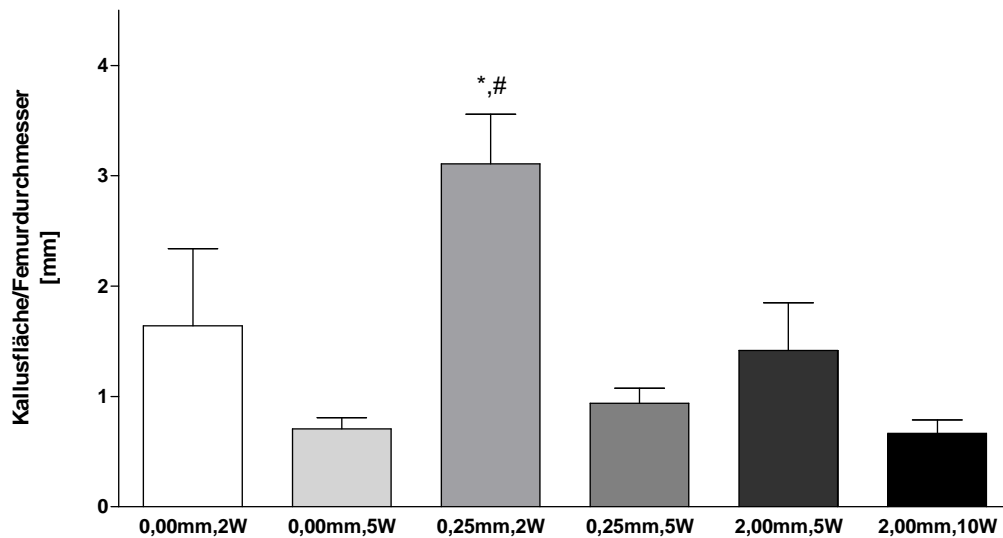


Abbildung 18: Darstellung der Kallusfläche im Verhältnis zum Femurdurchmesser ($MW \pm SF$, * $p < 0,05$ vs. 0,00mm (2 Wo.); # $p < 0,01$ vs. 0,00mm (5 Wo.), 0,25mm (5 Wo.), 2,00mm (5 Wo.) und 2,00mm (10 Wo.))

Zur weiteren Differenzierung der Kalluszusammensetzung untersuchten wir den Anteil an Knochen, Knorpel und Bindegewebe zu den einzelnen Zeitpunkten. Histologisch zeigte sich das Bild einer sekundären Frakturheilung mit Anteilen von Knorpel in allen Gruppen, welche auf eine enchondrale Knochenbildung hinweisen. Den größten Anteil an Knorpel innerhalb der Kallusfläche zeigten Tiere mit einer Spaltgröße von 0,00mm und 0,25mm nach zwei Wochen. Der Knorpelanteil in diesen beiden Gruppen war nach zwei Wochen signifikant größer als in allen anderen Gruppen.

Nach fünf Wochen kam es bei Tieren mit Spaltgröße von 0,00mm und 0,25mm zu einer signifikanten Abnahme des knorpeligen Kallusanteils sowie parallel hierzu zu einer signifikanten Zunahme des knöchernen Kallusanteils.

Der Kallus von Tieren mit einer Spaltgröße von 2,00mm bestand sowohl nach fünf als auch nach zehn Wochen zu einem überwiegenden Anteil aus Bindegewebe, wobei es zu einer signifikanten Zunahme des Bindegewebsanteils zwischen der fünften und zehnten Woche kam. Tiere mit einer Spaltgröße von 2,00mm präsentierten sich auch nach zehn Wochen mit dem Bild einer atrophen Pseudarthrose, bei ausbleibender Kallusbildung und einem Bindegewebsanteil von 81% am Gesamtkallus (Abbildung 19).

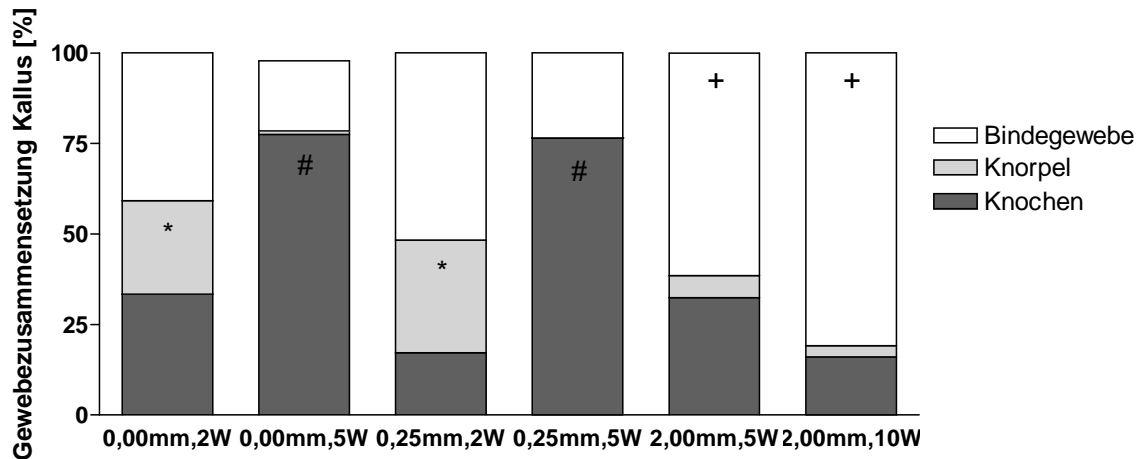


Abbildung 19: Dargestellt sind die prozentualen Anteile von Knochengewebe, Knorpelgewebe und Bindegewebe am gesamten periostalen Kallus. Signifikante Unterschiede im Knorpelgehalt sind mit (*) dargestellt: (* $p < 0,01$ vs. 0,00mm (5 Wo.), 0,25mm (5 Wo.), 2,00mm (5 Wo.) und 2,00mm (10 Wo.)); signifikante Unterschiede im Knochengehalt mit (#): (# $p < 0,01$ vs. 0,00mm (2 Wo.), 0,25mm (2 Wo.), 2,00mm (5 Wo.) und 2,00mm (10 Wo.)) und signifikante Unterschiede im Bindegewebsgehalt mit (+): (+ $p < 0,05$ vs. 0,00mm (5 Wo.) und 0,25mm (5 Wo.)).

Nach zwei Wochen kam es in keiner der untersuchten Gruppen zu einer knöchernen Überbrückung des Osteotomiespalts, was sich in einem Heilungs-Score von 0,25 in der Gruppe mit einer Spaltgröße von 0,00mm sowie einem Heilungs-Score von 1,25 in der Gruppe mit einer Spaltgröße von 0,25mm äußerte. Nach fünf Wochen fand sich eine komplette knöcherne Heilung in den Gruppen mit Spaltgrößen von 0,00mm und 0,25mm. In der Gruppe mit einer Spaltgröße von 2,00mm kam es weder nach fünf noch nach zehn Wochen zu einer knöchernen Überbrückung des Frakturspalts (Abbildung 20 u. 21).

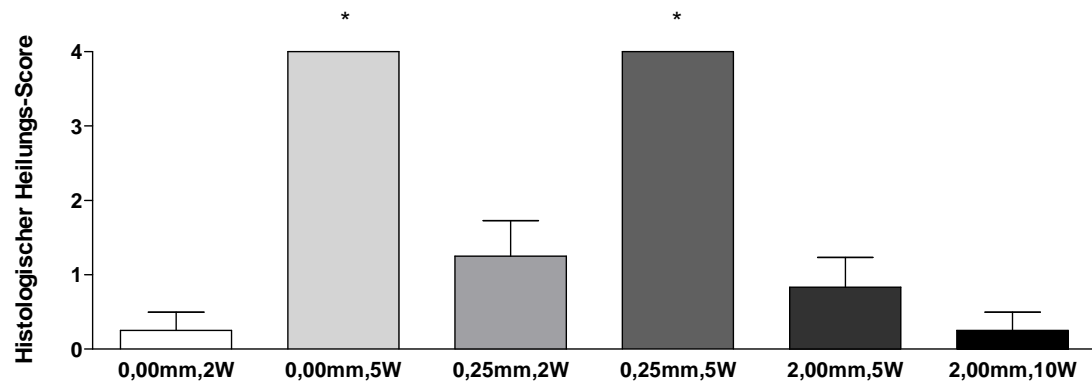


Abbildung 20: Diagramm des histologischen Scores zur Beurteilung der Frakturheilung nach Garcia et al. [23]. Ein Punktwert von 4 zeigt eine komplette knöcherne Überbrückung des Frakturspalts an ($MW \pm SF$; * $p < 0,001$ vs. 0,00mm (2 Wo.), 0,25mm (2 Wo.), 2,00mm (5 Wo.) und 2,00mm (10 Wo.)).

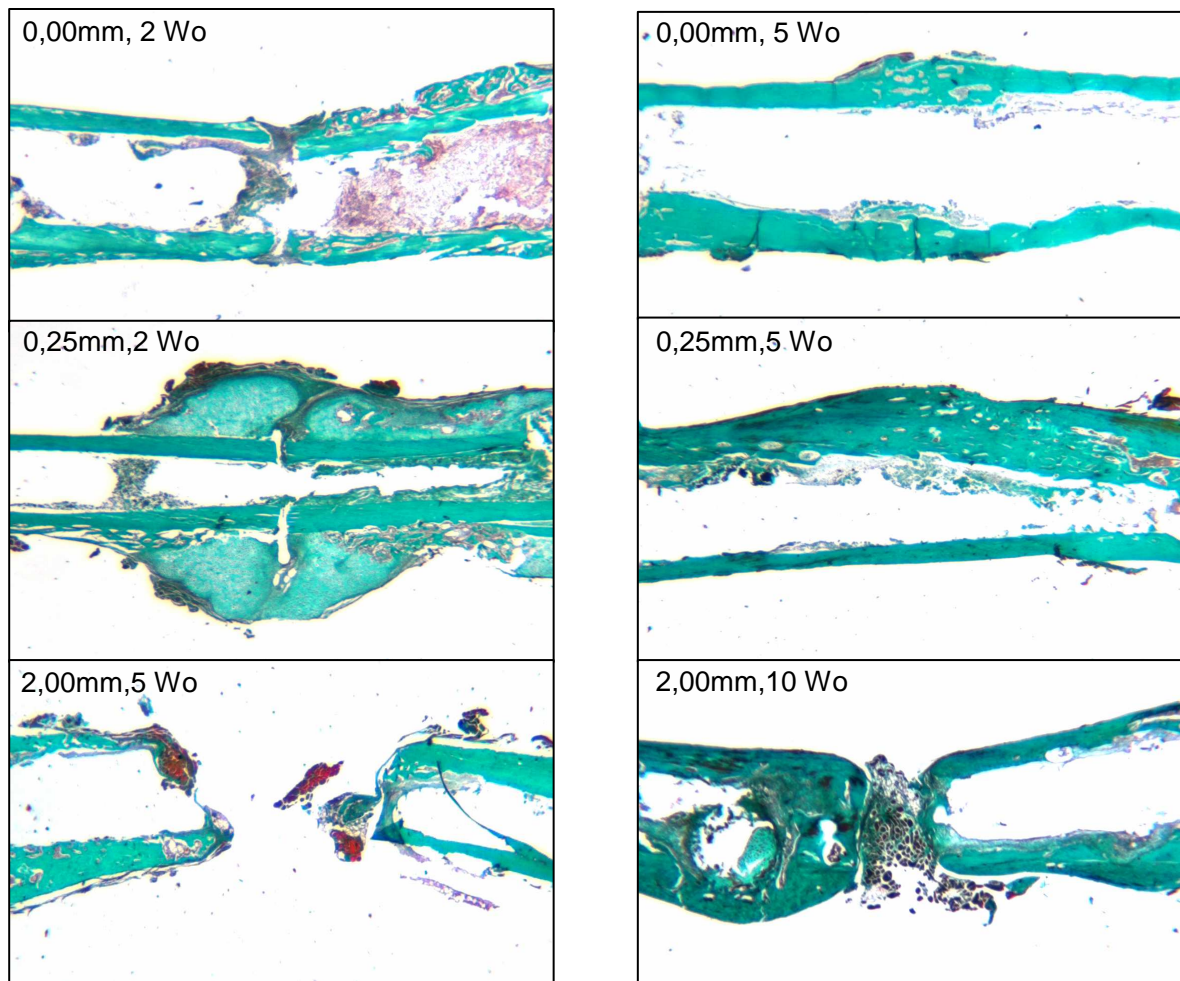


Abbildung 21: Repräsentative histologische Schnitte der einzelnen Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten. Die histologische Färbung erfolgte nach Masson und Goldner. Nach fünf Wochen ist bei einem Spalt von 0,00mm und 0,25mm deutlich eine knöcherne Überbauung der Fraktur zu sehen. In der Gruppe mit einer Spaltgröße von 2,00mm zeigt sich weder nach fünf noch nach zehn Wochen eine knöcherne Überbauung des Osteotomiespalts.

5 DISKUSSION

Während in der Vergangenheit vor allem Großtiermodelle für Frakturheilungsstudien verwendet wurden, geraten in jüngster Zeit vornehmlich Kleintiermodelle in den Mittelpunkt traumatologischer Forschung. Hier stellt die Maus ein ideales Versuchstier dar. Transgene Mausstämme, Knock-out-Tiere sowie eine große Anzahl biomedizinischer Werkzeuge, wie etwa monoklonale Antikörper, versprechen in Zukunft zunehmende Einblicke in die molekularen Mechanismen der Frakturheilung [55, 56]. Aufgrund der Größe der Tiere ist eine stabile Versorgung von Knochenbrüchen jedoch nur sehr schwer durchführbar. Dies ist aber erforderlich, da mechanische Einflüsse selbst große Auswirkungen auf den Heilungsprozess haben, wie z. B. auf die Expression von Wachstumsfaktoren, Zelldifferenzierung oder die Neubildung von Gefäßen [21, 41, 57]. Bislang ist es jedoch noch nicht gelungen, ein intramedulläres Osteosyntheseverfahren für die Maus zu etablieren, welches vergleichbare biomechanische Bedingungen bietet, wie sie z. B. bei Großtiermodellen oder beim Menschen selbstverständlich sind [36, 38, 40]. Auch hinsichtlich des späteren Transfers von Erkenntnissen aus der Forschung in den klinischen Alltag sollten bei Frakturstudien an Mäusen die gleichen Prinzipien zur Behandlung von Knochenbrüchen Anwendung finden wie beim Menschen. Mit dem LockingMouseNail wurde nun erstmals ein internes Osteosyntheseverfahren entwickelt, das eine mit humanen Implantaten vergleichbare Stabilität gewährleistet. Durch die Möglichkeit der achs- und rotationsstabilen osteosynthetischen Versorgung ist es uns des Weiteren gelungen, Segmentdefekte verschiedener Größe stabil zu versorgen.

5.1 Ex vivo Analyse der Implantatsteifigkeit

Die Ergebnisse der ex vivo Analyse zeigten signifikante Unterschiede hinsichtlich der Rotationsstabilität der getesteten Implantate. Der LockingMouseNail (LMN) erwies sich als signifikant stabiler als der in bisherigen Frakturstudien bei der Maus am meisten verwendete intramedulläre Pin, der keinerlei Rotationsstabilität aufwies. Beim Vergleich

der Rotationsstabilität des LMN mit intakten Mäusefemora zeigte sich jedoch eine signifikant geringere Stabilität für den LMN. Histing et al. zeigten, dass eine dem intakten Femur ähnliche Rotationsstabilität bislang nur unter Verwendung von einem externen Fixateur oder einer Verriegelungsplatte erreicht werden kann [42]. Diese unterlegene Steifigkeit des LockingMouseNail mit den von Histing et al. beschriebenen Implantaten ist jedoch aus unserer Sicht nicht von Nachteil. Im Gegenteil, klinisch verwendete Implantate weisen keine Steifigkeit auf, welche mit der von gesundem Knochen vergleichbar wäre. Da der LockingMouseNail eine Steifigkeit besitzt, welche mit der von humanen Marknägeln vergleichbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass der Heilungsverlauf eher der klinischen Situation entspricht, als bei Implantaten, die über die Steifigkeit klinisch verwendeter Osteosyntheseverfahren hinausgehen [58, 59].

Die erhöhte Rotationsstabilität des LMN verglichen mit üblichen intramedullären Pinverfahren kann darauf zurückgeführt werden, dass es sich beim LMN erstmals um ein mit Pins verriegeltes Implantat handelt in einer Technik, wie sie auch beim Menschen Anwendung findet. In der hier durchgeführten ex vivo Analyse wurde lediglich die Rotationsstabilität des LockingMouseNail im Vergleich mit anderen Osteosyntheseverfahren für Mäuse untersucht. Es kann jedoch angenommen werden, dass auch die axiale Stabilität des LMN durch das Vorhandensein der Verriegelungspins größer ist als bei nicht verriegelten intramedullären Techniken, bei denen es durch axialen Zug/Stauchung zu einem Teleskopeffekt kommen kann.

Vor dem Hintergrund, dass bei der osteosynthetischen Versorgung menschlicher Frakturen eine stabile Osteosynthese als Standard gilt, kann davon ausgegangen werden, dass bei der Verwendung des LMN die Abläufe bei der Frakturheilung denen der Frakturheilung bei Menschen näher kommen als bei bisherigen instabilen intramedullären Frakturmodellen.

5.2 In vivo Analyse

Aufgrund der Gewichtsentwicklung der operierten Tiere kann angenommen werden, dass die Implantation des LMN von den Mäusen gut toleriert wurde. Postoperativ kam es zu

einer altersentsprechenden Gewichtszunahme der Mäuse, was darauf schließen lässt, dass die Osteotomie des Femurs und das Vorhandensein des Implantats den Allgemeinzustand der Tiere nicht beeinträchtigten.

Die Frakturheilung bei Mäusen erstreckt sich in der Regel über einen Zeitraum von bis zu 60 Tagen, wobei nach 14 – 21 Tagen die Fraktur überbaut ist und im anschließenden Verlauf das Remodeling des Knochengewebes stattfindet [34, 40, 60].

Aus diesem Grund wählten wir bei den Gruppen mit einer geringen Spaltgröße (0,00mm und 0,25mm) die Beobachtungszeiträume von zwei Wochen und fünf Wochen. Wir gingen davon aus, dass, in Übereinstimmung mit vorherigen Frakturstudien an der Maus, nach zwei Wochen schon eine frühe Frakturheilung eintreten würde und nach fünf Wochen sich die Frakturzone im Zustand des Remodeling befände [37, 61].

Bei den Gruppen mit einer kritischen Größe des Segmentdefekts (2,00mm) wählten wir einen Analysezeitraum von fünf und zehn Wochen, da Garcia et al. zeigten, dass es bei einem Defekt von 1,80mm zu einem früheren Zeitpunkt noch zu keiner Überbauung der Fraktur und nach 15 Wochen gar zu einer Pseudarthrosenbildung gekommen war [23, 52, 62].

Die Ausfallquote von Tieren aufgrund von Lösungen der Verriegelungspins oder Lockerungen des LMN und des damit verbundenen Ausschlusses aus der Studie war mit 9,5%, in Konsens zu den von Auer et al. aufgestellten Richtlinien für Frakturstudien im Tiermodell, auf einem zufriedenstellend niedrigen Niveau [63]. Die beobachteten Pinlösungen traten vor allem bei den ersten operierten Tieren auf. Nach dem Auftreten erster Pinlockerungen wurde bei den folgenden Tieren explizit auf ein präzises Aufbohren der Pinlöcher geachtet unter Vermeidung mehrfachen Ein- und Ausgehens mit dem Bohrer. Somit sehen wir einen möglichen Grund für die spätere Reduktion der Pinlockerungen in der Lernkurve des Operators. Neben einer sorgfältigen Überprüfung der korrekten und stabilen Pinverankerung unter Vermeidung mehrfachen Vorbohrens ist eine ausreichend lange Trainingsphase der Operationstechnik vor der Studienanwendung des hier vorgestellten Modells zu empfehlen.

Das Auftreten von Infektionen des operierten Knochens bzw. des Implantats war mit 2,4% minimal und wies im Vergleich mit anderen Studien, bei denen sich eine Spannbreite an Infektionsraten von 0% bei Cheung et al. bis hin zu 11% bei Claes et al. zeigte, ein zufrieden stellendes Ergebnis [21, 40, 64]. In unserer Studie kam es in einem einzigen Fall zur Infektion mit konsekutiver Destruktion des operierten Femurs. Im Hinblick auf die Invasivität des Eingriffes mit offener Osteotomie und des Einbringens von drei Implantatkomponenten (Marknagel und zwei Verriegelungspins) mit unterschiedlichem Zugang war dieses Ergebnis zufriedenstellend. Ein Grund für die geringe Infektrate war mutmaßlich die präoperative Sterilisierung der Implantate sowie die großzügig durchgeführten Desinfektionsmaßnahmen sowohl an der Maus als auch an allen verwendeten Instrumenten, welche in dieser Art bei anderen Frakturmodellen nicht beschrieben sind [21, 36, 65]. Eine weitere Ursache könnte sein, dass nach Abschluss der Operation Knochen und Implantat keine Verbindung nach außen hatten, im Gegensatz zu Verfahren mit externen Fixateuren, bei denen dies grundsätzlich der Fall ist und die auch eine höhere Komplikationsrate aufweisen [21, 66, 67]. Obwohl Infektionen leicht erkannt und entsprechende Tiere aus Studien ausgeschlossen werden können, kann in zukünftigen Studien ggf. durch ein strenges, komplett steriles Vorgehen die Infektionsrate weiter gesenkt werden.

Die radiologische, biomechanische und histologische Untersuchung zeigte eine knöcherne Heilung der Osteotomien nach fünf Wochen in den Gruppen mit einer Spaltgröße von 0,00mm und 0,25mm. Im Gegensatz hierzu fanden sich nach zwei Wochen in den beiden Gruppen mit 0,00mm und 0,25mm Spaltgröße keine mechanischen, radiologischen oder histologischen Zeichen einer knöchernen Überbrückung der Osteotomien. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Frakturheilungsstudien bei der Maus überein, welche gezeigt haben, dass es ab der dritten postoperativen Woche (ab 21 Tagen) zu einer kompletten Frakturheilung kommt [60, 68]. Im Folgezeitraum kommt es dann im Bereich des Frakturkallus zu Umbauvorgängen, dem so genannten Remodeling [16, 60].

Biomechanisch fand sich in Übereinstimmung mit den histologischen und radiologischen Ergebnissen nach fünf Wochen eine knöcherne Überbauung mit einer Steifigkeit von etwa 70% im Vergleich zum gesunden kontralateralen Femur. Eine Stabilität von 100%,

entsprechend dem kontralateralen gesunden Femur, ist eventuell deswegen nicht erreicht worden, weil zu diesem Zeitpunkt (fünf Wochen postoperativ) die Remodelingphase noch nicht abgeschlossen war. Isaksson et al. berichteten in diesem Zusammenhang von Zeiträumen von mehr als sieben Wochen bis zum Abschluss des Remodeling bei Mäusen [60].

Nach zwei Wochen fanden wir trotz histologisch und radiologisch nachweisbarer Kallusbildung eine im Vergleich mit anderen Studien niedrigere Stabilität, welche unter 1% im Vergleich zum gesunden kontralateralen Femur lag [36, 69]. Dies mag darin begründet liegen, dass diese Studien im Gegensatz zu unserer Studie in geschlossenen Frakturmodellen erfolgten. Da ein Weichteilschaden bekanntermaßen die Frakturheilung negativ beeinflusst [7, 70], kann die nach zwei Wochen von uns gemessene geringere Steifigkeit ggf. auf den durch den operativen Zugang bedingten Weichteilschaden zurückgeführt werden. Ein weiterer Unterschied unserer Studie zu anderen Frakturstudien an der Maus, die nach zwei Wochen Steifigkeiten bis zu 20% zu gesunden Femora berichten [65], ist eine geringere Kallusbildung bei Tieren, die mittels LMN stabilisiert wurden [64, 69]. Instabilität und die damit verbundenen interfragmentären Bewegungen sind ein Stimulus zur Ausbildung eines großen Frakturkallus [21]. Somit ist anzunehmen, dass es in der vorliegenden Studie aufgrund der höheren Steifigkeit des Implantats zu einer geringeren Kallusbildung gekommen ist. Der geringere Kallus nach zwei Wochen in der vorliegenden Arbeit geht ebenso mit einer geringeren Querschnittsfläche einher. Diese Verringerung der Querschnittsfläche auf Höhe der Osteotomie erklärt möglicherweise in Teilen die von uns gemessene geringere Biegesteifigkeit [21].

Die Heilung der osteotomierten Femora erfolgte durch eine sekundäre Frakturheilung mit enchondraler Knochenbildung im Zentrum des Kallus nahe der Osteotomie und intramembranöser Knochenbildung, ausgehend vom osteotomiefernen Periost. Wie auch von Gerstenfeld et al. und anderen Autoren beschrieben, zeigten Tiere mit einem Frakturspalt von 0,00mm und 0,25mm histologisch nach zwei Wochen einen hohen Knorpelanteil am Gesamtkallus [71, 72]. Knochengewebe hingegen stellte zu dem frühen Zeitpunkt nach zwei Wochen nur einen geringen Anteil am Gesamtkallus dar. Dieses Bild entsprach der Proliferationsphase der Frakturheilung, während der im Rahmen der

enchondralen Knochenbildung eine Knorpelzwischenstufe als Matrix für eine spätere Substitution durch neues Knochengewebe gebildet wird [18].

Nach fünf Wochen bestand das Kallusgewebe in den Gruppen mit Spaltgrößen von 0,00mm und 0,25mm überwiegend aus Knochen. Interessanterweise zeigte sich hier kein Knorpelanteil mehr. Der fehlende Knorpel innerhalb des Kallus ist dadurch zu erklären, dass die Osteotomien bereits knöchern überbaut waren und somit kein mechanischer Stimulus mehr für eine weitere enchondrale Knochenbildung bestand. Die knöcherne Überbauung der Osteotomie mit entsprechender mechanischer Festigkeit zeigte sich auch in unserer biomechanischen Untersuchung. Hierbei zeigten Tiere mit Spaltgrößen von 0,00mm und 0,25mm eine hohe Steifigkeit von 70% im Vergleich zum kontralateralen gesunden Femur. Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich in den Gruppen mit einer Spaltgröße von 0,00mm und 0,25mm die geheilten osteotomierten Femora schon in der Phase des Remodelings befanden. Dies steht in Übereinstimmung mit den von Einhorn et al. beschriebenen Abschnitten der Frakturheilung, bei denen es nach Abschluss der knöchernen Konsolidierung zu keiner weiteren enchondralen Knochenbildung kommt, sondern die Knochenstruktur entsprechend den mechanischen Anforderung umgebaut wird [7].

Im Vergleich zu den Tieren mit einer Spaltgröße von 0,25mm zeigten Tiere mit einer Spaltgröße von 0,00mm nach zwei und fünf Wochen einen tendenziell geringeren Kallusumfang. Dieses Ergebnis könnte darauf zurückzuführen sein, dass Tiere ohne Osteomiespalt (0,00mm) durch den Kontakt und die Kompression der Knochenenden eine größere Primärstabilität aufwiesen, als dies bei Tieren mit einer Spaltgröße von 0,25mm der Fall war. Dies wäre in Übereinstimmung mit verschiedenen anderen Studien an der Maus oder am Schaf, die zeigen konnten, dass eine größere Stabilität mit einer geringeren Kallusbildung einhergeht [21, 27, 41].

Trotz des direkten Kontaktes der Frakturende und deren anatomischer Reposition kam es bei diesen Tieren jedoch nicht zu einer direkten Frakturheilung. Dies deutet darauf hin, dass es auch beim LMN trotz der hohen mechanischen Stabilität im Vergleich mit bisher verwendeten intramedullären Osteosynthesetechniken möglicherweise zu Mikrobewegungen im Frakturbereich kam. Diese Mikrobewegungen stimulieren die

Knorpel- und Kallusbildung im Frakturbereich und führen zur sekundären, vornehmlich enchondralen Knochenbildung [21, 73]. Ein weiterer Grund für das Ausbleiben einer primären Frakturheilung kann in der Knochenstruktur der Maus selbst liegen, welche kein Havers-System aufweist. Dieses Havers-System ist jedoch maßgeblich verantwortlich für eine direkte Durchbauung eines frakturierten Knochens und damit der primären Frakturheilung. Da unseres Wissens bis dato noch kein Frakturmodell zur Untersuchung einer primären Frakturheilung in der Literatur beschrieben ist, bleibt unklar, ob die Maus bedingt durch ihre Anatomie hierzu überhaupt in der Lage ist.

Im Gegensatz zu Tieren mit einer Spaltgröße von 0,00mm und 0,25mm zeigten Tiere mit einer Spaltgröße von 2,00mm weder nach fünf noch nach zehn Wochen eine knöcherne Überbauung der Osteotomie. Unsere Untersuchungen zeigten, dass es bei diesen Tieren zur Entstehung einer atrophen Pseudarthrose kam. Diese zeigte sich an den für atrophe Pseudarthrosen typischen radiologischen Merkmalen, wie etwa der fehlenden Überbrückung der Osteotomie, der ausbleibende Kallusbildung sowie den typischen abgerundeten und sklerosierten Knochenenden [23]. Von besonderem Interesse erscheint hierbei, dass diese Merkmale atropher Pseudarthrosen von der fünften bis zur zehnten Woche einen progredienten Verlauf aufwiesen. Dies zeigt, dass es sich hier nicht um eine stark verlangsamte Frakturheilung handelte, sondern entsprechend einer Pseudarthrose der Heilungsprozess zum Erliegen gekommen war. Auch die histologische Zusammensetzung des Gewebes im Frakturspalt deutete auf das Vorliegen einer atrophen Pseudarthrose hin. So bestand das Kallusgewebe überwiegend aus Bindegewebe und nur zu einem geringen Anteil aus Knochen und Knorpel. Die von uns beobachtete Zunahme von Bindegewebe und parallel hierzu die Abnahme an Knochen im Kallus zwischen der fünften und zehnten Woche sprechen ebenfalls für ein Erliegen der Knochenheilung. Insbesondere aufgrund des rückläufigen Anteils an Knochen im Kallus gehen wir nicht davon aus, dass es nach einem längeren Untersuchungszeitraum zu einer knöchernen Überbauung des 2,00mm Osteotomiespaltes gekommen wäre. Die histologische Zusammensetzung des Kallusgewebes mit überwiegendem Anteil an Bindegewebe entspricht Angaben aus der Literatur für atrophe Pseudarthrosen in verschiedenen Spezies [30, 48, 74].

Im Gegensatz zu Tieren mit einer kleinen Frakturspaltgröße von 0,00mm und 0,25mm zeigten Tiere mit einer Spaltgröße von 2,00mm nach zehn Wochen eine deutlich geringere Kallusbildung. Der Rückgang der Kallusbildung ist am ehesten durch ein Sistieren der Knochenheilung zu erklären. Verschiedene andere Studien beschreiben ebenfalls eine verminderte Kallusbildung bei Pseudarthrosen, insbesondere bei Frakturen mit persistierendem großen interfragmentären Spalt [21, 75].

Im Gegensatz zu den meisten bisher beschriebenen Pseudarthrosemodellen im Kleintier führten wir in der Gruppe mit einer Spaltgröße von 2,00mm keine Deperiostierung durch. Somit ist im Gegensatz zu den vorgenannten Studien nicht davon auszugehen, dass eine gestörte periostale Blutversorgung oder der Verlust osteogener Zellen im Periost Ursache für die Entstehung einer Pseudarthrose waren. Vielmehr ist der große interfragmentäre Spalt von 2,00mm als kritische Defektgröße und Ursache für das Versagen einer knöchernen Konsolidierung anzusehen. Verschiedene klinische Studien [3, 76, 77] als auch Tiermodelle [23, 78, 79] haben gezeigt, dass ein persistierender interfragmentärer Spalt einen wesentlichen Risikofaktor für die Entstehung einer Pseudarthrose darstellt. Die Ursachen für das Ausbleiben einer knöchernen Konsolidierung sind noch weitgehend unbekannt. Dennoch haben verschiedene Studien gezeigt, dass in Abhängigkeit der Spezies gewisse Defektgrößen das endogene Potential zur Knochenheilung überschreiten. So scheint die kritische Defektgröße, ab der eine Heilung ausbleibt, von der Größe des untersuchten Tieres und des Durchmessers des untersuchten Knochens abzuhängen.

Verschiedene Autoren postulieren, dass eine gestörte Vaskularisierung die Ursache für die Entstehung einer Pseudarthrose sein könnte [24, 48]. Gerade bei Segmentdefekten könnte aufgrund der Größe des Defekts und der hypoxischen Umgebung innerhalb des interfragmentären Spalts die Vaskularisierung eine entscheidende Rolle spielen. In der Tat haben verschiedene Studien in Tiermodellen mit kritischen Segmentdefekten gezeigt, dass durch eine Therapie mit dem proangiogenen Wachstumsfaktor VEGF die Vaskularisierung verbessert und eine Pseudarthrose zur Ausheilung gebracht werden kann [80-82]. Inwieweit die beobachtete Verbesserung der Frakturheilung auf eine Verbesserung der Vaskularisierung zurückgeführt werden kann, oder aber durch beschriebene Effekte von VEGF auf osteogene Vorläuferzellen [11, 81] oder eine vermehrte Stammzellrekrutierung

bedingt wird [82], geht aus den vorliegenden Arbeiten nicht hervor. Interessanterweise haben verschiedene Studien in jüngerer Zeit gezeigt, dass etablierte Pseudarthrosen sehr gut vaskularisiert sind [23, 24, 30]. Weitere Studien müssen zukünftig zeigen, inwieweit eine frühe Störung der Vaskularisierung für ein Versagen der Knochenheilung verantwortlich ist. Der LMN kann hier in künftigen Studien als klinisch repräsentatives Modell dazu beitragen, diese Fragen zu beantworten und neue Behandlungsstrategien im Tierversuch zu evaluieren.

Beim Menschen ist eine Pseudarthrose im Allgemeinen definiert als das Ausbleiben einer knöchernen Konsolidierung einer Fraktur über einen Zeitraum von 6 Monaten. Hierbei handelt es sich um einen willkürlich festgelegten Zeitraum, der definiert wurde, um klinisch eine Pseudarthrose mit ausbleibender Frakturheilung zu charakterisieren und von Verläufen mit verzögerter Heilung abzugrenzen. Über die Festlegung eines bestimmten Zeitraums hinaus wurden verschiedene weitere Definitionen zur klinischen Charakterisierung einer Pseudarthrose publiziert. Marsh et al. definierten eine Pseudarthrose als das Ausbleiben einer progredienten knöchernen Kallusreaktion auf konsekutiven Röntgenaufnahmen [83]. Entsprechend dieser Definition fanden wir nach zehn Wochen sogar einen Rückgang der radiologischen Kallusgröße. Entsprechend fand sich auch ein Rückgang der histologischen Kallusgröße sowie eine Zunahme des Anteils an Bindegewebe am Gesamtkallus. Funktionell war dies begleitet von einer Reduktion der Biegesteifigkeit nach zehn Wochen, was darauf hinweist, dass es sich bei der ausbleibenden knöchernen Konsolidierung in der Gruppe mit einer Spaltgröße von 2,00mm nach zehn Wochen in der Tat um eine Pseudarthrose und keine verzögerte Frakturheilung handelt. Beim Menschen beträgt die Zeit bis zur knöchernen Konsolidierung von Femurschaftfrakturen etwa zwölf Wochen [23]. Von einer Pseudarthrose spricht man hier nach Definition üblicherweise, wenn es nach einem Zeitraum von sechs Monaten zu keiner knöchernen Konsolidierung gekommen ist, d.h. nach einer Verdopplung des normalen Heilungszeitraums. Wenn man von einer normalen Heilungszeit von maximal fünf Wochen für Femurfrakturen in der Maus ausgeht [23, 36, 60], wie wir sie auch in den Gruppen mit kleinem Osteotomiespalt gefunden haben (0,00mm und 0,25mm), finden wir in der Gruppe mit 2,00mm Spaltgröße ebenfalls eine ausbleibende Heilung nach Verdopplung des normalen Heilungszeitraums. In Übereinstimmung mit bisher

veröffentlichten Modellen zur Pseudarthroseentstehung bei der Maus lässt sich somit nach einem Zeitraum von zehn Wochen mit einer gewissen Rechtfertigung von einer Pseudarthrose sprechen.

Bislang wurden nur drei weitere Pseudarthrosenmodelle an der Maus publiziert. Die Entstehung einer Pseudarthrose gelang in den beschriebenen Modellen durch die Erzeugung von Segmentdefekten mit Deperiostierung [23], einer instabilen Osteosynthese mit Devaskularisierung [84] sowie einer Distraction der Frakturenden [47].

Choi et al. beschrieben als Erste ein Modell zur Untersuchung von Pseudarthrosen bei Mäusen [47]. Hier kam es durch die Distraction einer Osteomie der Tibia zu einer ausbleibenden Heilung nach einem Zeitraum von 27 Tagen. Während wir in der aktuellen Arbeit eine atrophe Pseudarthrose bei 100% der untersuchten Tiere fanden, kam es bei dem Modell von Choi et al. zu einer knöchernen Konsolidierung der Osteotomie in 40% der Fälle. Der kurze Untersuchungszeitraum von nur 27 Tagen lässt weiterhin die Frage offen, ob sich die Osteotomien im weiteren Verlauf nach Beendigung der Distraction knöchern konsolidiert hätten. Somit bleibt unklar, ob es sich in dem beschriebenen Modell um ein echtes Pseudarthrosenmodell oder lediglich um eine durch die Distraction bedingte Verzögerung des Heilungsverlaufs handelt. Ein weiterer Nachteil des Modells von Choi et al. ist die klinische Relevanz des Modells. Obwohl es auch im Rahmen einer Osteodistraction, wie sie erstmals von Ilizarov beschrieben wurde [85], zu einer ausbleibenden Frakturkonsolidierung kommen kann, sind Pseudarthrosen nach Frakturen nicht Folge einer mechanischen Distraction der Frakturenden.

Garcia et al. gelang es erstmals, ein Modell zur atrophen Pseudarthrose an der Maus zu etablieren [23]. Dies erfolgte durch Erzeugung eines 1,8mm großen Segmentdefekts. So konnte in Übereinstimmung mit der vorliegenden Studie bei 100% der Tiere eine Pseudarthrose nach zehnwöchigem Analysezeitraum erzielt werden. Garcia et al. konnten des Weiteren zeigen, dass es bei dem von ihnen verwendeten Modell auch nach fünfzehn Wochen zu keiner Heilung der Segmentdefekte kam. Dementsprechend gehen wir davon aus, dass auch in unserer Studie der Heilungsprozess nach zehn Wochen zum Erliegen gekommen ist und somit keine weitere Kallusbildung und Heilungstendenz über den Zeitraum von zehn Wochen hinaus zu erwarten ist. Im Gegensatz zu der vorliegenden

Studie führten Garcia et al. zusätzlich eine chirurgische Entfernung des Periosts durch, um eine Pseudarthrose zu erzielen. Auch ohne Manipulationen am Periost beobachteten wir eine ausbleibende knöcherne Konsolidierung bei 100% der Tiere. Dies kann in dem größeren Segmentdefekt von 2,00mm im Vergleich zu den 1,8mm bei dem von Garcia et al. beschriebenen Modell begründet sein.

Oetgen et al. gelang es ebenfalls, ein Pseudarthrosenmodell an der Maus zu entwickeln. Durch eine instabile Osteosynthese und Deperiostierung kam es hier zur Ausbildung einer hypertrophen Pseudarthrose [84]. Die Ursachen als auch die Behandlung von hypertrophen Pseudarthrosen unterscheiden sich jedoch wesentlich von denen atropher Pseudarthrosen. Während hypertrophe Pseudarthrosen im Großteil der Fälle durch eine instabile Osteosynthese mit gesteigerter interfragmentärer Bewegung bedingt sind und durch eine stabile Versorgung zur Ausheilung gebracht werden können, sind die Ursachen für atrophe Pseudarthrosen noch größtenteils unbekannt und schwer zu therapieren.

In Bezug auf die klinische Relevanz weist der LMN verglichen mit den anderen genannten Modellen Vorteile auf. Die Behandlung von Schaftfrakturen langer Röhrenknochen erfolgt beim Menschen bevorzugt mittels intramedullärer Marknagelung. Mit dem LMN steht nun erstmals ein Osteosyntheseverfahren zur Verfügung, welches eine osteosynthetische Versorgung von Femurfrakturen der Maus ermöglicht, wie sie beim Menschen als Standard gilt. Da die mechanische Stabilität wesentlich den Prozess der Frakturheilung beeinflusst, ist davon auszugehen, dass eine stabile osteosynthetische Versorgung, wie durch den LMN gewährleistet, eher dem Heilungsverlauf beim Menschen nach Osteosynthese entspricht als Modelle mit einer instabilen Osteosynthese. Nicht nur die normale Frakturheilung nach Stabilisierung von 0,00mm Spaltgrößen oder von 0,25mm Spaltgrößen ist mit der klinischen Situation vergleichbar, sondern auch die Entstehung einer Pseudarthrose unter Verwendung eines Segmentdefekts von 2,00mm. Auch diese weist Parallelen zur Pseudarthrosenentstehung beim Menschen auf. Ein persistierender interfragmentärer Spalt gilt als ein wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung einer Pseudarthrose beim Menschen. Größere Segmentdefekte nach Traumata oder im Rahmen von Infektionen stellen immer noch ein großes klinisches Problem dar und erfordern oft mehrfache operative Eingriffe. Weitere Studien unter Verwendung des LMN können dazu beitragen,

die pathophysiologischen Zusammenhänge bei der Entstehung von Pseudarthrosen aufgrund von Segmentdefekten zu untersuchen. Des Weiteren können neue Therapiestrategien zur Behandlung von Knochendefekten unter Verwendung des LMN erprobt werden.

5.3 Zukünftige Anwendungsmöglichkeiten

Der LMN erlaubt die stabile osteosynthetische Versorgung von Segmentdefekten verschiedener Größe, von 0,00mm bis 2,00mm, im Femur der Maus. Wir konnten zeigen, dass durch Variation der Defektgröße der Heilungsverlauf beeinflusst werden kann, so dass sowohl eine normale Frakturheilung als auch eine Pseudarthrosenbildung untersucht werden können. Darüber hinaus ist auch ein Studium mechanischer Einflüsse auf die Frakturheilung, entweder im direkten Vergleich mit instabilen Osteosynthesetechniken oder durch Weglassen der Verriegelungspins, denkbar.

Weiterhin ermöglicht der LMN aufgrund seines offenen Operationszugangs im Gegensatz zu geschlossenen Frakturmodellen die Applikation von diversen Substanzen in den Frakturspalt. So könnte beispielsweise vor der klinischen Anwendung gezielt die Wirkung bestimmter Signalmoleküle und Wachstumsfaktoren auf die Frakturheilung untersucht werden [86-88].

Des Weiteren erlaubt der LMN die stabile Integration von Knochenersatzstoffen in Femursegmentdefekte der Maus. Dies ermöglicht die Erprobung neuer Knochenersatzstoffe, wie sie im Rahmen des „tissue-engineering“ hergestellt werden. Diese können erstmals mittels des LMN in Femursegmentdefekte der Maus integriert und stabilisiert werden.

Während die normale Frakturheilung gut untersucht ist, sind die Mechanismen der Pseudarthrosenentstehung noch unzureichend bekannt und stellen die behandelnden Ärzte immer noch vor eine große Herausforderung. Insbesondere durch die Möglichkeit der Untersuchung von atrophischen Pseudarthrosen kann der LMN dazu beitragen, die pathophysiologischen Zusammenhänge der Pseudarthrosenentstehung besser zu verstehen,

und so neue Therapieansätze zu entwickeln. Solche neuen therapeutischen Ansätze könnten dann ebenfalls in dem hier vorgestellten Frakturmodell der Maus mittels des LMN vor einer möglichen klinischen Anwendung evaluiert werden.

5.4 Fazit

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dem in dieser Arbeit vorgestellten LockingMouseNail ein neues Osteosyntheseverfahren zur Stabilisierung von Femurfrakturen in der Maus entwickelt wurde. Der LMN erlaubt eine standardisierte osteosynthetische Versorgung reproduzierbarer Osteotomien bei Mäusen.

Durch die Möglichkeit, definierte Segmentdefekte unterschiedlicher Größe am Knochen zu erzeugen und zu stabilisieren, kann der Heilungsverlauf beeinflusst werden, so dass sowohl die normale Frakturheilung, als auch der gestörte Verlauf mit ausbleibender Heilung und Pseudarthrosenbildung untersucht werden kann.

Da der hier vorgestellte LockingMouseNail im Vergleich zu derzeit verwendeten Marknagelungstechniken für Mäuse eine höhere Stabilität aufweist, steht mit ihm erstmals ein stabiles intramedulläres Osteosyntheseverfahren zur Verfügung, das vergleichbar mit dem Verriegelungsmarknagel beim Menschen ist. Da Schaftfrakturen beim Menschen zumeist mittels eines intramedullären Implantats versorgt werden, verspricht der LMN eine größere Vergleichbarkeit mit der klinischen Frakturheilung beim Menschen.

In der Anwendung könnte der LockingMouseNail dazu beitragen, die molekularen Mechanismen sowohl einer normalen und als auch einer gestörten Frakturheilung besser zu verstehen. Des Weiteren könnte im Vergleich mit instabilen Frakturmodellen der biomechanische Einfluss auf die Frakturheilung bei Mäusen weiter analysiert werden.

Die Möglichkeit zur stabilen Versorgung von Segmentdefekten ermöglicht es weiterhin, mit dem LockingMouseNail verschiedene Knochenersatzmaterialien sowie neue Stoffe aus dem Bereich des Tissue engineering in vivo in Knochendefekte der Maus stabil zu integrieren und zu untersuchen. Neben den Vorteilen zu Untersuchungen auf molekularer Ebene kann im Mausmodell, im Vergleich zu Großtiermodellen, in einem kürzeren

Zeitraum eine wesentlich größere Anzahl an Tieren bei niedrigerem finanziellen Aufwand untersucht werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Destatis, *Diagnosedaten der Krankenhauspatientinnen und Patienten (einschl. Sterbe- und Stundenfälle) 2008*, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2009.
2. Murnaghan, M., G. Li, and D.R. Marsh, *Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced fracture nonunion: an inhibition of angiogenesis?* J Bone Joint Surg Am, 2006. 88 Suppl 3: p. 140-7.
3. Babhulkar, S., K. Pande, and S. Babhulkar, *Nonunion of the diaphysis of long bones*. Clin Orthop Relat Res, 2005(431): p. 50-6.
4. Marsh, D.R. and G. Li, *The biology of fracture healing: optimising outcome*. Br Med Bull, 1999. 55(4): p. 856-69.
5. Sobotta, J. and U. Welsch, *Sobotta Lehrbuch Histologie Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie*. 2003, München: Urban & Fischer. 598.
6. Wolff, J., *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. 1892.
7. Einhorn, T.A., *The cell and molecular biology of fracture healing*. Clin Orthop Relat Res, 1998(355 Suppl): p. S7-21.
8. Horner, K., K. Loeffler, and M. Holtzmann, *Comparison of the histologic structure of the compact bone of the long hollow bones of mouse, hamster, rat, guinea pig, rabbit, cat, and dog during development*. Anat Histol Embryol, 1997. 26(4): p. 289-95.
9. Jowsey, J., *Symposium on equine bone and joint diseases. Age and species differences in bone*. Cornell Vet, 1968. 58: p. Suppl:74-94.
10. Fiedler, J., et al., *IGF-I and IGF-II stimulate directed cell migration of bone-marrow-derived human mesenchymal progenitor cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. 345(3): p. 1177-83.
11. Mayr-Wohlfart, U., et al., *Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts*. Bone, 2002. 30(3): p. 472-7.
12. M, L.I., E.F. Eriksen, and C. Bunger, *Bone morphogenetic protein-2 but not bone morphogenetic protein-4 and -6 stimulates chemotactic migration of human*

- osteoblasts, human marrow osteoblasts, and U2-OS cells.* Bone, 1996. 18(1): p. 53-7.
13. Hirose, S., et al., *A histological assessment on the distribution of the osteocytic lacunar canalicular system using silver staining.* J Bone Miner Metab, 2007. 25(6): p. 374-82.
 14. Abu-Amer, Y., et al., *Substrate recognition by osteoclast precursors induces C-src/microtubule association.* J Cell Biol, 1997. 137(1): p. 247-58.
 15. Teitelbaum, S.L., Y. Abu-Amer, and F.P. Ross, *Molecular mechanisms of bone resorption.* J Cell Biochem, 1995. 59(1): p. 1-10.
 16. Einhorn, T.A., *The science of fracture healing.* J Orthop Trauma, 2005. 19(10 Suppl): p. S4-6.
 17. Mundlos, S. and B.R. Olsen, *Heritable diseases of the skeleton. Part I: Molecular insights into skeletal development-transcription factors and signaling pathways.* Faseb J, 1997. 11(2): p. 125-32.
 18. McKibbin, B., *The biology of fracture healing in long bones.* J Bone Joint Surg Br, 1978. 60-B(2): p. 150-62.
 19. Grundnes, O. and O. Reikeras, *The role of hematoma and periosteal sealing for fracture healing in rats.* Acta Orthop Scand, 1993. 64(1): p. 47-9.
 20. Bourque, W.T., M. Gross, and B.K. Hall, *Expression of four growth factors during fracture repair.* Int J Dev Biol, 1993. 37(4): p. 573-9.
 21. Claes, L., et al., *Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing.* J Orthop Res, 1997. 15(4): p. 577-84.
 22. Reikeras, O., *Healing of osteotomies under different degrees of stability in rats.* J Orthop Trauma, 1990. 4(2): p. 175-8.
 23. Garcia, P., et al., *Development of a reliable non-union model in mice.* J Surg Res, 2008. 147(1): p. 84-91.
 24. Reed, A.A., et al., *Vascularity in a new model of atrophic nonunion.* J Bone Joint Surg Br, 2003. 85(4): p. 604-10.
 25. Brighton, C.T. and R.M. Hunt, *Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus.* J Bone Joint Surg Am, 1991. 73(6): p. 832-47.

26. Claes, L., K. Eckert-Hubner, and P. Augat, *The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing*. J Orthop Res, 2002. 20(5): p. 1099-105.
27. Garcia, P., et al., *A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: impact of stability on fracture healing*. J Biomech, 2008. 41(8): p. 1689-96.
28. Augat, P., et al., *Early, full weightbearing with flexible fixation delays fracture healing*. Clin Orthop Relat Res, 1996(328): p. 194-202.
29. Kenwright, J. and A.E. Goodship, *Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures*. Clin Orthop Relat Res, 1989(241): p. 36-47.
30. Brownlow, H.C. and A.H. Simpson, *Metabolic activity of a new atrophic nonunion model in rabbits*. J Orthop Res, 2000. 18(3): p. 438-42.
31. O'Loughlin, P.F., et al., *Selection and development of preclinical models in fracture-healing research*. J Bone Joint Surg Am, 2008. 90 Suppl 1: p. 79-84.
32. Dumont, C., et al., *Long-term effects of saw osteotomy versus random fracturing on bone healing and remodeling in a sheep tibia model*. J Orthop Res, 2008.
33. Gerstenfeld, L.C., et al., *Comparison of Effects of the Bisphosphonate Alendronate Versus the RANKL Inhibitor Denosumab on Murine Fracture Healing*. J Bone Miner Res, 2008.
34. Hiltunen, A., H.T. Aro, and E. Vuorio, *Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice*. Clin Orthop Relat Res, 1993(297): p. 23-7.
35. Mundlos, S. and B.R. Olsen, *Heritable diseases of the skeleton. Part II: Molecular insights into skeletal development-matrix components and their homeostasis*. Faseb J, 1997. 11(4): p. 227-33.
36. Manigrasso, M.B. and J.P. O'Connor, *Characterization of a closed femur fracture model in mice*. J Orthop Trauma, 2004. 18(10): p. 687-95.
37. Connolly, C.K., et al., *A reliable externally fixated murine femoral fracture model that accounts for variation in movement between animals*. J Orthop Res, 2003. 21(5): p. 843-9.
38. Holstein, J.H., et al., *Development of a locking femur nail for mice*. J Biomech, 2007. 40(1): p. 215-9.

39. Holstein, J.H., et al., *Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration*. J Orthop Trauma, 2009. 23(5 Suppl): p. S31-8.
40. Cheung, K.M., et al., *An externally fixed femoral fracture model for mice*. J Orthop Res, 2003. 21(4): p. 685-90.
41. Augat, P., et al., *Local tissue properties in bone healing: influence of size and stability of the osteotomy gap*. J Orthop Res, 1998. 16(4): p. 475-81.
42. Histing, T., et al., *Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture*. J Orthop Res, 2009.
43. Mark, H., et al., *An external fixation method and device to study fracture healing in rats*. Acta Orthop Scand, 2003. 74(4): p. 476-82.
44. Hiltunen, A., E. Vuorio, and H.T. Aro, *A standardized experimental fracture in the mouse tibia*. J Orthop Res, 1993. 11(2): p. 305-12.
45. Bonnarens, F. and T.A. Einhorn, *Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone*. J Orthop Res, 1984. 2(1): p. 97-101.
46. Skoglund, B., C. Forslund, and P. Aspenberg, *Simvastatin improves fracture healing in mice*. J Bone Miner Res, 2002. 17(11): p. 2004-8.
47. Choi, P., et al., *Cellular and molecular characterization of a murine non-union model*. J Orthop Res, 2004. 22(5): p. 1100-7.
48. Lu, C., et al., *Ischemia leads to delayed union during fracture healing: a mouse model*. J Orthop Res, 2007. 25(1): p. 51-61.
49. Drosse, I., et al., *Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective*. Tissue Eng Part C Methods, 2008. 14(1): p. 79-88.
50. Kokubu, T., et al., *Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur*. J Orthop Res, 2003. 21(3): p. 503-10.
51. Shefelbine, S.J., et al., *Intact fibula improves fracture healing in a rat tibia osteotomy model*. J Orthop Res, 2005. 23(2): p. 489-93.
52. Schoen, M., et al., *Introduction of a new interlocked intramedullary nailing device for stabilization of critically sized femoral defects in the rat: A combined biomechanical and animal experimental study*. J Orthop Res, 2008. 26(2): p. 184-9.

53. Goldberg, V.M., et al., *Bone grafting: role of histocompatibility in transplantation*. J Orthop Res, 1985. 3(4): p. 389-404.
54. Parfitt, A.M., et al., *Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee*. J Bone Miner Res, 1987. 2(6): p. 595-610.
55. Uusitalo, H., et al., *A metaphyseal defect model of the femur for studies of murine bone healing*. Bone, 2001. 28(4): p. 423-9.
56. Khan, S.N., et al., *Identification of Novel Gene Expression in Healing Fracture Callus Tissue by DNA Microarray*. Hss J, 2008.
57. Garcia-Aznar, J.M., et al., *Computational simulation of fracture healing: influence of interfragmentary movement on the callus growth*. J Biomech, 2007. 40(7): p. 1467-76.
58. Lill, H., et al., *Proximal humeral fractures: how stiff should an implant be? A comparative mechanical study with new implants in human specimens*. Arch Orthop Trauma Surg, 2003. 123(2-3): p. 74-81.
59. Wu, C.C. and C.L. Tai, *A biomechanical comparison of unlocked or locked reamed intramedullary nails in the treatment of mid-third simple transverse femoral shaft fractures*. Chang Gung Med J, 2006. 29(3): p. 275-82.
60. Isaksson, H., et al., *Remodeling of fracture callus in mice is consistent with mechanical loading and bone remodeling theory*. J Orthop Res, 2008.
61. O'Keefe, R.J., et al., *COX-2 has a critical role during incorporation of structural bone allografts*. Ann N Y Acad Sci, 2006. 1068: p. 532-42.
62. Aalami, O.O., et al., *Applications of a mouse model of calvarial healing: differences in regenerative abilities of juveniles and adults*. Plast Reconstr Surg, 2004. 114(3): p. 713-20.
63. Auer, J.A., et al., *Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use*. BMC Musculoskelet Disord, 2007. 8: p. 72.
64. Holstein, J.H., et al., *Development of a Stable Closed Femoral Fracture Model in Mice*. J Surg Res, 2008.

65. Histing, T., et al., *An internal locking plate to study intramembranous bone healing in a mouse femur fracture model*. J Orthop Res. 28(3): p. 397-402.
66. Thompson, Z., et al., *A model for intramembranous ossification during fracture healing*. J Orthop Res, 2002. 20(5): p. 1091-8.
67. Miclau, T., et al., *Effects of delayed stabilization on fracture healing*. J Orthop Res, 2007. 25(12): p. 1552-8.
68. Gardner, M.J., et al., *Pause insertions during cyclic in vivo loading affect bone healing*. Clin Orthop Relat Res, 2008. 466(5): p. 1232-8.
69. Holstein, J.H., et al., *Rapamycin affects early fracture healing in mice*. Br J Pharmacol, 2008. 154(5): p. 1055-62.
70. Perren, S.M., *[Optimizing the degree of fixation stability based on the strain theory]*. Orthopade. 39(2): p. 132-8.
71. Holstein, J.H., et al., *Development of a stable closed femoral fracture model in mice*. J Surg Res, 2009. 153(1): p. 71-5.
72. Gerstenfeld, L.C., et al., *Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis*. J Histochem Cytochem, 2006. 54(11): p. 1215-28.
73. Augat, P., et al., *Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone*. Osteoporos Int, 2005. 16 Suppl 2: p. S36-43.
74. Arinzeh, T.L., et al., *Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect*. J Bone Joint Surg Am, 2003. 85-A(10): p. 1927-35.
75. Egger, E.L., et al., *Effects of axial dynamization on bone healing*. J Trauma, 1993. 34(2): p. 185-92.
76. Einhorn, T.A., *Enhancement of fracture-healing*. J Bone Joint Surg Am, 1995. 77(6): p. 940-56.
77. Pullen, C., et al., *Treatment of post-traumatic humeral diaphyseal nonunion with bone loss*. J Shoulder Elbow Surg, 2003. 12(5): p. 436-41.
78. Markel, M.D. and J.J. Bogdanske, *The effect of increasing gap width on localized densitometric changes within tibial osteotomies in a canine model*. Calcif Tissue Int, 1994. 54(2): p. 155-9.

79. Cook, S.D., et al., *The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects*. J Bone Joint Surg Am, 1994. 76(6): p. 827-38.
80. Eckardt, H., et al., *Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model*. J Bone Joint Surg Br, 2005. 87(10): p. 1434-8.
81. Street, J., et al., *Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(15): p. 9656-61.
82. Geiger, F., et al., *Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects*. J Bone Miner Res, 2005. 20(11): p. 2028-35.
83. Marsh, D., *Concepts of fracture union, delayed union, and nonunion*. Clin Orthop Relat Res, 1998(355 Suppl): p. S22-30.
84. Oetgen, M.E., et al., *Development of a femoral non-union model in the mouse*. Injury, 2008. 39(10): p. 1119-26.
85. Ilizarov, G.A., *Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening*. Clin Orthop Relat Res, 1990(250): p. 8-26.
86. Kugimiya, F., et al., *Involvement of endogenous bone morphogenetic protein (BMP) 2 and BMP6 in bone formation*. J Biol Chem, 2005. 280(42): p. 35704-12.
87. Peng, H., et al., *VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis*. J Bone Miner Res, 2005. 20(11): p. 2017-27.
88. Yoshimura, Y., et al., *Colocalization of noggin and bone morphogenetic protein-4 during fracture healing*. J Bone Miner Res, 2001. 16(5): p. 876-84.

7 DANK

Ich möchte mich bei meiner Familie bedanken, die mich immer unterstützt hat und hinter mir stand, ganz besonders bei meinen Eltern, die mir das Studium und die Dissertation ermöglicht haben. Vielen Dank.

Außerdem danke ich meiner Freundin Tina Zerbe, die immer für mich da war und sehr geduldig mit mir war, wenn ich viele Stunden im Labor verbrachte.

Als Nächstes bedanke ich mich herzlich bei Patric Garcia, bei dem ich wissenschaftliches Arbeiten lernte und der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, auch wenn Probleme auftauchten. Danke für die tolle Betreuung.

Danken möchte ich Romano Matthys vom AO Development Institute in Davos, der mir den LMN zur Verfügung stellte und auf Verbesserungsvorschläge immer offen einging. Danke für die konstruktive Zusammenarbeit.

Ebenfalls gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Tim Pohlemann, der es mir ermöglichte, in seiner Klinik zu promovieren und Ergebnisse meiner Dissertation auf dem Deutschen Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2008 in Berlin vorzustellen. Vielen Dank für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Auch danke ich Prof. Dr. Menger dafür, dass ich die Operationen und Analysen im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg durchführen durfte.

Dank an Julia Schmalenbach und Moritz Klein sowie alle anderen Mitglieder der unfallchirurgischen Forschungsgruppe für die Hilfe und Zusammenarbeit während dieser Promotion.

Schließlich möchte ich mich herzlich bei Elisabeth Gluding, Janine Becker, Kati Jordan und Chantal Enderlin sowie allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg bedanken, ohne deren unkomplizierte Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Die Arbeit im Labor hat mir immer viel Spaß gemacht, was auch an der tollen Zusammenarbeit mit allen Mitarbeitern lag. Vielen Dank.

8 LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name:	Herwerth
Vorname:	Simon
Geburtsdatum:	14.06.1982
Geburtsort:	Tübingen
Adresse:	Poststraße 4, 66424 Homburg/Saar
Telefon:	06841-9599647
E-Mail:	s.herwerth@hotmail.de
Familienstand:	ledig

AUSBILDUNG

Schul Ausbildung:

1988-1992	Grundschule (Nehren)
1992-2001	Karl-von-Frisch-Gymnasium (Dußlingen)
Juni 2001	Abitur

September 2001-Juni 2002	Zivildienst Marienkrankenhaus Hamburg
--------------------------	---------------------------------------

Hochschulausbildung:

Oktober 2002	Immatrikulation an der Universität des Saarlandes, Studiengang Sportwissenschaften (Diplom)
Oktober 2003	Immatrikulation an der Universität des Saarlandes, Studiengang Humanmedizin
September 2005	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: befriedigend)
Oktober 2005-Juli 2006	Auslandsstudium im Rahmen des Erasmusprogramms an der Universidad de Oviedo (Asturien/Spanien)
August 2008-Juli 2009	Praktisches Jahr
25.08.-14.12.2008	Radiologie Universitätskliniken des Saarlandes
15.12.2008-05.04.2009	Chirurgie Universitätskliniken des Saarlandes
06.04.-26.07.2009	Innere Medizin Universitätskliniken des Saarlandes
Juni 2009	Step 1 des USMLE (1. Teil des US-Examens Medizin)
Dezember 2009	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut)
Dezember 2009	Approbation als Arzt
Februar 2010	Step 2 CK des USMLE (2. Teil des US-Examens Medizin)

Beruflicher Werdegang

März 2010-Mai 2010 Assistenzarzt an der Klinik für Unfallchirurgie, Medizinische Hochschule Hannover (Direktor Herr Prof. Dr. C. Krettek)

Seit Mai 2010 Assistenzarzt an der Klinik für Urologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum d. Saarlandes, Homburg (Direktor Herr Prof. Dr. M. Stöckle)

Promotion

Seit Dezember 2006 Doktorarbeit an der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes (Direktor Herr Prof. Dr. T. Pohlemann):

„Entwicklung eines verriegelten Marknagels für Mäusefemora“

Oktober 2008 Posterpräsentation „Der LockingMouseNail – ein Verriegelungsmarknagel für die Maus“ auf dem Deutschen Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie in Berlin

Dezember 2009 Veröffentlichung „The LockingMouseNail - A new implant for standardized stable osteosynthesis in mice“, The Journal of surgical research, December 10, 2009

Famulaturen

01.09-01.10.2006 Klinik für Innere Medizin I, Onkologie, Hämatologie, Klin. Immunologie und Rheumatologie, Universitätsklinikum des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. M. Pfreundschuh)

19.02-18.03.2007	Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. D. Kohn)
23.07-23.08.2007	Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. R. Larsen)
11.02-10.03.2008	Klinik für Psychiatrie, Privatklinik Meiringen/Schweiz (Direktor: Prof. Dr. M. Soyka)
31.03-11.04.2008	Klinik für Urologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. M. Stöckle)